MYOKARDIALE PROTEINSYNTHESE IN-VITRO: ISOLIERUNG, SUBZELLULÄRE VERTEILUNG UND ZELLFREIE TRANSLATION MYOKARDIALER POLYRIBOSOMEN UND mRNS

Reinhard Kandolf

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546820_0072

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern
Direktor: Professor Dr. med. G. Riecker

MYOKARDIALE PROTEINSYNTHESE IN-VITRO: ISOLIERUNG, SUBZELLULÄRE VERTEILUNG UND ZELLFREIE TRANSLATION MYOKARDIALER POLYRIBOSOMEN UND mRNS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

REINHARD KANDOLF
aus Neustadt am Kulm
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: ..... Prof. Dr. G. Riecker
Dekan: ..... Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1981

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	
1.1.	Allgemeine Prinzipien der Genexpression und Proteinsynthese in eukaryonten Zellen	1
1.1.1.	Transkription	1
1.1.2.	Translation	4
1.1.3.	Organspezifische Besonderheiten	7
1.2.	Genexpression und Proteinsynthese im Herzmuskel	8
1.3.	Untersuchungsziele	11
2.	METHODEN	
2.1.	Tiermaterial	13
2.2.	Chemikalien	13
2.3.	Isolierung von Polyribosomen und mRNS aus Herzmuskel	14
2.4.	Isolierung von Polyribosomen und mRNS aus Leber	16
2.5.	Isolierung von pH 5 Enzymen aus Herzmuskel und Leber	17
2.6.	Sedimentationsanalyse von Polyribosomen, mikrosomaler RNS und mRNS auf Sucrose-Gradienten	17
2.7.	Präparation der zellfreien Systeme (Weizenkeimsystem und mRNS-abhängiges Retikulozyten-Lysat-System)	18
2.8.	In-vitro Translation von Polyribosomen und mRNS in zellfreien Systemen	20
2.9.	Identifizierung der zellfrei synthetisierten Proteine	21
2.10.	Isolierung von Standardproteinen aus Herzmuskel	22
2.11.	Chemische Isolierung von in-vitro synthetisiertem Aktin	25
2.12.	Subzelluläre Fraktionierung von Herzmuskel	26
2.13.	Verschiedenes	26

Seite

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung und Charakterisierung myokardialer Polyribosomen und mRNS 27

3.1.1. Isolierung myokardialer Polyribosomen 27

3.1.2. Isolierung myokardialer, mikrosomaler RNS und mRNS 31

3.1.3. Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens myokardialer Polyribosomen auf Sucrose-Gradienten 34

3.1.4. Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens der myokardialen, mikrosomalen RNS und mRNS auf Sucrose-Gradienten 36

3.1.5. In-vitro Translation myokardialer Polyribosomen 40

3.1.6. In-vitro Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem und im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System 42

3.1.7. Identifizierung der in-vitro synthetisierten, myokardialen Proteine 49

3.2. Chemische Isolierung von zellfrei synthetisiertem Aktin 55

3.3. Subzelluläre Verteilung der myokardialen Polyribosomen, Gesamt-RNS und mRNS 60

4. DISKUSSION 66

5. ZUSAMMENFASSUNG 76

6. LITERATUR 80

7. ABKÜRZUNGEN 93

DANKSAGUNG

LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeine Prinzipien der Genexpression und Proteinsynthese in eukaryonten Zellen

Seit den grundlegenden Untersuchungen von Avery (1944), Watson and Crick (1953) und Jacob and Monod (1961) hat eine Vielzahl molekularbiologischer Arbeiten dazu beigetragen, ein detailliertes Verständnis der Mechanismen der Genexpression in eukaryonten Organismen zu entwickeln. Abb. 1 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Schritte der Organisation der Genexpression und Proteinsynthese in eukaryonten Zellen.

1.1.1. Transkription

Die in der DNS des Zellkerns gespeicherte, genetische Information ist in einzelnen Transkriptionsabschnitten, sog. Transkriptons angeordnet. Jedes Transkripton enthält eine oder mehrere kodierende DNS-Sequenzen (Gene im eigentlichen Sinne) (Scherrer et al. 1979). Die einzelnen Gene sind voneinander durch strukturelle DNS-Sequenzen ohne kodierende Information getrennt, aber auch Teile der einzelnen Gene selbst können durch zwischengelagerte, intervenierende DNS-Sequenzen (Introns) räumlich voneinander getrennt sein. Erst im Verlauf der im Zellkern stattfindenden Prozessierung von RNS-Vorstufen werden sie zu einer funktionellen Einheit zusammengefügt (RNS-splicing) (Abelson 1979, Lewin 1980, Revel and Groner 1978, Scherrer et al. 1979).

Im Nukleoplasma bzw. Nukleolus sind verschiedene DNS-abhängige RNS-Polymerasen für die Synthese spezifischer RNS-Vorstufen zuständig (Hager et al. 1977, Holland et al. 1977, Lewin 1980, Roeder 1976).

Primäre mRNS-Vorstufen (HnRNS) werden an den jeweiligen Transkriptons mit Hilfe der RNS-Polymerase II des Nukleoplasmas synthetisiert, die für 20-40% der gesamten, zellulären RNS-Syntheseaktivität verantwortlich ist (Abelson 1979, Darnell 1976, Lewin 1975,

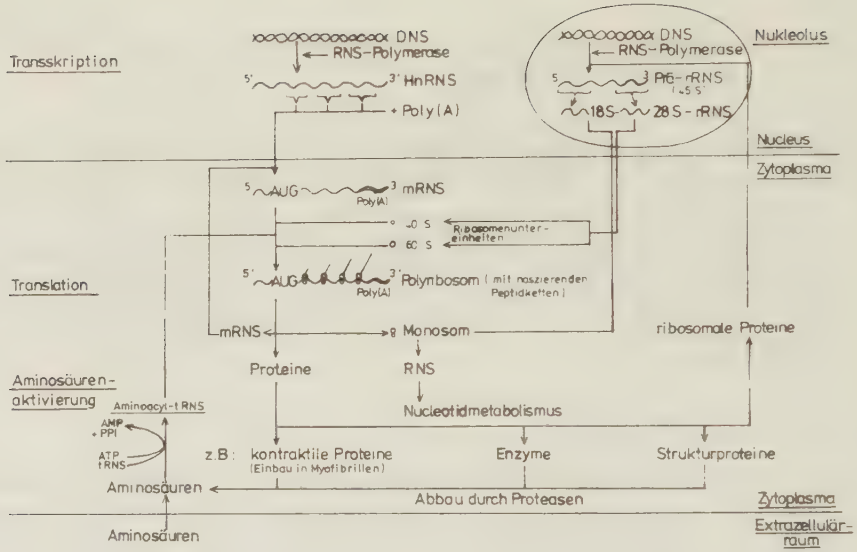


Abb. 1: Schematische Darstellung der Organisation der Genexpression in eukaryonten Zellen (Zähringer 1979 b, 1981 c)

1980, Roeder 1976, Scherrer et al. 1979). HnRNS liegt stets als Komplex mit einer Reihe nukleärer Proteine vor (HnRNP) (Heinrich et al. 1978, Stevenin and Jacob 1979). Ca. 95% der HnRNS verbleiben im Zellkern und werden dort wieder abgebaut (Scherrer et al. 1970, 1979). Bei 1-10% der HnRNS (primäre Prä-mRNS) erfolgt ein noch nicht ganz verstandenes Prozessieren der Endprodukte (mRNS), wie Abspaltung großer RNS-Präkursoren, Entfernung intervenierender Sequenzen (RNS-splicing), 3'-Polyadenylierung, Capping und Methylierung des 5'-Endes, sowie interne Methylierung (Abelson 1979, Darnell 1976, Lewin 1975, 1980, Revel and Groner 1978, Scherrer et al. 1979). Alle bisher vorliegenden Arbeiten zum RNS-splicing zeigen, daß die kodierenden Sequenzen von mRNS-Molekülen nach Entfernung intervenierender Sequenzen in der gleichen Reihenfolge

vorliegen wie im primären Transkriptionsprodukt (Kolinearität) (Lewin 1980, Scherrer et al. 1979). Somit besteht bislang kein Anhalt für eine diskutierte Neukombination genetischen Materials im Rahmen der Prozessierung von mRNS (Lewin 1980).

Die Synthese der tRNS-Vorstufen erfolgt durch RNS-Polymerase III, die ebenfalls im Nukleoplasma vorliegt und für 10% der gesamten nukleären Transkriptionsaktivität verantwortlich ist. Ferner induziert RNS-Polymerase III die Synthese von 5S rRNS und einigen niedermolekularen, nukleären RNS-Molekülen (Bogenhagen et al. 1980, Lewin 1980, Roeder 1976). tRNS-Vorstufen enthalten zum Teil intervenierende Sequenzen, die wahrscheinlich die Ausbildung der Konformation des Anticodon-Arms induzieren. Erst nach deren Entfernung kann eine Aminoacylierung erfolgen (Knapp et al. 1979, Odgen et al. 1979).

An der im Nukleolus befindlichen DNS erfolgt die Transkription der für ribosomale RNS kodierenden Gensequenzen mit Hilfe der RNS-Polymerase I, die für 50-70% der gesamten nukleären Transkriptionsaktivität zuständig ist (Chambon 1975, Hadjiolow 1977, Lewin 1980, Perry 1976). Das entstandene primäre Transkriptionsprodukt ist die Prä-rRNS (Sedimentationskonstante 45S), an die sich ribosomale Strukturproteine anlagern. Diese werden im Zytoplasma synthetisiert und in den Nukleolus transportiert (Chambon 1975, Perry 1976, Wool 1979). Nach Entfernung sog. Spacer-Sequenzen, die im Unterschied zur prozessierten rRNS nicht methyliert werden, entstehen 18S rRNS (enthalten in der 40S Ribosomenuntereinheit), 5.8S rRNS und 28S rRNS (enthalten in der 60S Ribosomenuntereinheit) (Grummt et al. 1979, Khan and Madan 1978, Kominami et al. 1978, Nazar et al. 1976, Wellauer et al. 1974, Wellauer and Dawid 1979).

Die 5S rRNS (Teil der großen Ribosomenuntereinheit) wird unabhängig hiervon durch RNS-Polymerase III des Nukleoplasmas synthetisiert (Bogenhagen et al. 1980, Roeder 1976).

Die beschriebenen vier rRNS-Spezies werden in allen eukaryonten Organismen gefunden und liegen in äquimolaren Mengen in der Zelle vor (Lewin 1980).

1.1.2. Translation

Im Zytoplasma der einzelnen Gewebe liegen unterschiedliche Mengen (10-80%) der vom Nukleus ins Zytoplasma transportierten mRNS in Form nicht-translatierter, freier mRNS vor (Civelli et al. 1980, Zähringer et al. 1976 a, b, Zähringer 1981 c). Erst nach Anlagerung der 40S und 60S Ribosomenuntereinheiten zur Formierung des 80S-(Met-tRNS)-mRNS-Initiationskomplexes kann die mRNS in die Aminosäuresequenz der enkodierten Proteine translatiert werden.

Die Geschwindigkeit der Translation wurde in-vivo und in-vitro gemessen. Sie beträgt bei 25°C 0.8 Aminosäuren pro Sekunde für die Translation von Ovalbumin-mRNS und Hämoglobin-mRNS in-vitro (Lodish and Jacobson 1972, Palmiter 1973), bei 37°C 4-5 Aminosäuren pro Sekunde für die Translation von Hämoglobin-mRNS (Hunt et al. 1972) und Myosin-mRNS (Morris et al. 1972) in-vitro. In intakten Zellen wurden Werte von 1-6 Aminosäuren pro Sekunde gemessen (Dintzis 1961, Hunt et al. 1969, Lingrel and Barsook 1963, Palmiter 1975, Schreiber 1971, Scornik 1974).

Bei 10^3-$2x10^4$ verschiedenen mRNS-Molekülen (Perry 1976, Scherrer et al. 1979) reicht die in der mRNS-Population einer Zelle enthaltene Information für die Synthese ebensovieler, verschiedener Proteine.

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, daß zytoplasmäre mRNS als mRNS-Protein-Komplex (mRNP) vorliegt (Bag and Sarkar 1976, Bester et al. 1980, Jain et al. 1979 a, b, Jain and Sarkar 1979, Kumar and Peterson 1975, Maundrell et al. 1979, Princen et al. 1979, Spirin 1969, 1979). Die funktionelle Bedeutung dieses Proteinanteils ist weitgehend unklar. Belegt wurde u.a. eine spezifische Stimulierung der Initiation der Translation (Bester et al. 1980).

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Faktoren, deren koordiniertes Zusammenwirken bei Initiation, Elongation und Termination der Proteinsynthese erforderlich ist (Übersichten bei Brot 1977, Caskey 1980, Harris and Pestka 1977, Lewin 1980, Miller

Tabelle 1: Reaktionspartner bei der Translation von mRNS in Protein bei Eukaryonten

Reaktionsabschnitt	Reaktionspartner
Kettenstart (Initiation)	- Initiator-Methionyl-tRNS, eIF 2, GTP - 40S Ribosomenuntereinheit, eIF 3, eIF 4C - mRNS (Cap-Struktur, AUG-Kodon, Ribosomenbindungsabschnitt), eIF 1, eIF 4A, eIF 4B, eIF 4E, ATP - 60S Ribosomenuntereinheit, eIF 5, Mg^{++} ⟶ 80S-(Met-tRNS)-mRNS-Initiationskomplex
Kettenverlängerung (Elongation)	- mRNS im Verbund mit Ribosomen (Polysom) und naszierender Peptidkette - Aminoacyl-tRNS - Elongationsfaktoren (EF 1, EF 2) - Peptidyltransferase - GTP - Mg^{++}, K^{+}
Kettenabschluß (Termination)	- mRNS (Terminationskodon) mit Ribosomen und fertiggestellter Proteinkette - Terminationsfaktor - Peptidyltransferase - Dissoziationsfaktor - GTP

Modifiziert nach Anderson et al. (1974), Brot (1977), Caskey (1980), Harris and Pestka (1977), Lewin (1980), Miller and Weissbach (1977), Revel(1977), Richter and Isono (1977), Schreiber (1971), Thomas et al. (1981), Zähringer (1979 b, 1981 c).

and Weissbach 1977, Revel 1977, Richter and Isono 1977, Thomas et al. 1981). Inhibierende und stimulierende Substanzen können die Translation an jedem dieser Teilschritte entscheidend beeinflussen.

Nach Fertigstellung der Proteinkette lösen sich die Ribosomen von

der mRNS ab und zerfallen in ihre 40S und 60S Untereinheiten. Die Bindung von eIF 3 und wahrscheinlich eIF 4C (Antiassoziationsfaktoren nach Thomas et al. 1981) an die 40S Ribosomenuntereinheit verhindert eine spontane Assoziation der Ribosomenuntereinheiten vor Formierung des 80S-(Met-tRNS)-mRNS-Initiationskomplexes.

Die neusynthetisierten, nukleären Strukturproteine werden in den Nukleus bzw. Nukleolus transportiert (s.o.), die übrigen, neusynthetisierten Proteine (Enzyme, Membranproteine, myofibrilläre Proteine, mitochondriale Proteine, etc.) an den jeweiligen Ort ihrer Funktion.

Aus der Zelle sezernierte Proteine werden im allgemeinen von membrangebundenen Polyribosomen und deren mRNS synthetisiert, in der Zelle retinierte Proteine von freien Polyribosomen und deren mRNS (Übersicht bei Zähringer et al. 1977 a, Zähringer 1981 c).

Post-translationär werden viele der neusynthetisierten Proteine, insbesondere die aus der Zelle sezernierten Proteine, noch modifiziert, wie durch Abspaltung kürzerer oder längerer Peptidketten von Präkursormolekülen, Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, etc. (Übersichten bei Campbell and Blobel 1976, Gallop and Paz 1975, Hew and Yip 1976, Kivirikko and Risteli 1976, Munro and Steinert 1975, Peters 1977, Schreiber and Urban 1978, Shore and Tata 1977, Zähringer et al. 1977 a). Da am Herzmuskel zu diesem Thema noch keine Arbeiten vorliegen und der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf dem Gebiet der myokardialen Protein-Neusynthese liegt, wird hier auf dieses wichtige Kapitel des zellulären Proteinmetabolismus nicht näher eingegangen.

Eine Sonderstellung nehmen die mitochondrialen Proteine ein. Mitochondrien verfügen über eine eigene, doppelsträngige, zirkuläre DNS (Piko and Matsumoto 1977, Rajamanickam et al. 1979, Sanger 1981, Wintersberger 1978) und enthalten sämtliche, für Transkription und Translation benötigten Enzymsysteme. Die Nukleotidsequenz der mitochondrialen DNS ist kürzlich aufgeklärt worden (Sanger 1981) und besteht aus ca. 16 000 Nukleotidpaaren. Die mitochondriale DNS enthält ca. 35-38 Gene (Sanger 1981), die die genetische Information für die mitochondriale rRNS (12S und 16S rRNS) (Ashwell and Work 1970, Borst 1981, Hirsch and Penman 1973, Robberson et al. 1971,

Sanger 1981), tRNS (22-23 verschiedene, mitochondriale tRNS-Spezies) (Borst 1981, Sanger 1981) und für ca. 8 verschiedene, mitochondriale mRNS-Gruppen enthalten (Hirsch and Penman 1973, Sanger 1981). Die mitochondriale mRNS kodiert für diejenigen mitochondrialen Proteine, die ausschließlich innerhalb der Mitochondrien synthetisiert werden (10-13 Proteine, vorwiegend Glykoproteine der inneren Mitochondrienmembran) (Aloni and Attardi 1971, Ashwell and Work 1970, Borst 1981, Casey et al. 1972, Halbreich and Rabinowitz 1971, Hirsch and Penman 1973, Hollenberg et al. 1969, Munro and Steinert 1975, Nass and Buck 1970, Rabinowitz 1973, Sanger 1981). Hierzu gehören u.a. die Untereinheit 6 der mitochondrialen ATPase, die Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochrom c Oxidase, sowie Cytochrom b (Borst 1981, Sanger 1981). Die übrigen 90% der mitochondrialen Proteine werden an zytoplasmatischen, freien Polyribosomen synthetisiert und in die Mitochondrien eingeschleust (Schatz 1981).

Die Organisation der mitochondrialen Proteinsynthese zeigt Ähnlichkeiten zu der von prokaryonten Organismen, wie z.B. in der Größe der Ribosomen (60S), der Inhibierbarkeit durch Chloramphenicol und der fehlenden Inhibierbarkeit durch Cycloheximid (Perlman et al. 1973). Da die mitochondriale mRNS von HeLa-Zellen jedoch ähnlich der mRNS eukaryonter Zellen ein Poly(A)-Segment von 50-80 Nukleotiden enthält (Hirsch and Penman 1973, Perlman et al. 1973), und mRNS aus prokaryonten Zellen generell keine Poly(A)-Sequenz besitzt (Perry 1976), erscheint eine evolutionsmäßige Herkunft der Mitochondrien aus Bakterien, wie manchmal diskutiert, zweifelhaft (Munro and Steinert 1975, Perlman et al. 1973).

1.1.3. Organspezifische Besonderheiten

Alle vorliegenden Arbeiten zur Genexpression und Proteinsynthese in eukaryonten Organismen demonstrieren, daß im generellen Ablauf von Transkription und Translation in eukaryonten Zellen grundsätzlich nur geringe Unterschiede bestehen.

Einer dieser Unterschiede liegt darin begründet, daß in manchen Organen, wie z.B. der Leber sowie in exokrinen und endokrinen

Organen, der Großteil der neusynthetisierten Proteine aus der Zelle sezerniert wird, in anderen Organen (z.B. Herz) diese dagegen in der Zelle retiniert werden. Diese Aufgabe wird von der jeweiligen Organzelle durch eine spezielle, intrazelluläre Organisationsform der Proteinsynthese gelöst: Sezernierte Proteine werden von membrangebundenen Polyribosomen, retinierte Proteine von frei im Zytoplasma liegenden Polyribosomen synthetisiert (Übersicht bei Zähringer et al. 1977 a, b, 1979 a, b).

Untersuchungen zur individuellen Regulation der Expression spezifischer Gene in einzelnen Geweben werden durch die neu entwickelten Techniken der Synthese von cDNS sowie der bakteriellen Klonierung Plasmid-gebundener cDNS durchführbar, befinden sich jedoch noch im Anfangsstadium.

1.2. Genexpression und Proteinsynthese im Herzmuskel

Die Isolierung, Charakterisierung und zellfreie Translation von Polyribosomen und mRNS aus verschiedenen Organen hat während der letzten zwei Jahrzehnte ein Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Genexpression und Proteinsynthese aus molekularbiologischer Sicht ermöglicht.

Während die Isolierung intakter Polyribosomen und mRNS inzwischen nahezu routinemäßig an vielen Organen durchgeführt wird, u.a. aus Leber (Baliga et al. 1968, Blobel and Potter 1967, Driscoll et al. 1978, Ramsey and Steele 1976, Sala-Trepat et al. 1978, Zähringer et al. 1975, 1976 a-c, 1977 a, b, 1979 a), Nieren (Irwin et al. 1975, Ouellette et al. 1976), Gehirn (Baliga et al. 1976, Bantle et al. 1976 a, b), Eileiter/Eierstöcke (Groner et al. 1977, Means et al. 1975, Palmiter 1973, 1975), Retikulozyten (Lingrel 1972, McKeehan 1974), Pankreas (Chan et al. 1976), Tumorzellen (Stevens and Williamson 1973, Wall et al. 1977), Plazenta (Laga et al. 1970), Skelettmuskel (Bag and Sarkar 1975, Heywood et al. 1967, 1974, Metafora et al. 1980, Mondal et al. 1974, Przybyla and Strohman 1974, Sarkar et al. 1973) und aus anderen Organen (Übersichten bei Brawerman 1974, Taylor 1979, Zähringer et al. 1977 a), zeigten Polyribosomenpräparationen aus Herzmuskel niedere und sehr unterschiedliche Ausbeuten (Hjalmarson et al. 1975, Koelbel et al. 1970, Meerson et al. 1974,

Morgan et al. 1971, Zähringer et al. 1979 b), darüberhinaus eine degradierte Struktur bei der Analyse auf Sucrose-Gradienten (Hjalmarson et al. 1975, Meerson et al. 1974, Morgan et al. 1971). Arbeiten über Isolierung und zellfreie Translation von myokardialer mRNS aus älteren/erwachsenen Versuchstieren oder aus menschlichem Myokard lagen dagegen überhaupt noch nicht vor.

Dies lag nicht zuletzt an den Schwierigkeiten, die der Herzmuskel molekularbiologischen Untersuchungsmethoden entgegensetzt. Im Unterschied zu anderen Organen besitzt der Herzmuskel älterer Tiere - und natürlich auch des Menschen - durch die in den Myofibrillen angeordneten, kontraktilen Proteine eine sehr rigide, intrazelluläre Struktur, die es nicht erlaubte, intakte Polyribosomen oder mRNS in ausreichender Menge aus dem Herzmuskel zu isolieren.

Arnold and Siddiqui (1979) berichteten dagegen über die Isolierung von Myosin-Leicht-Ketten-mRNS aus embryonalen Hühnerherzen und es erscheint möglich, daß die Methode dieser Autoren auch am Herzmuskel älterer Tiere einsetzbar sein könnte, was jedoch einer Überprüfung bedarf.

Trotz der geschilderten, experimentellen Schwierigkeiten waren einige Grundzüge der Organisation der Proteinsynthese im Herzmuskel bekannt (Übersicht bei Zähringer 1979 b, 1981 c).

Im Gegensatz zur Leber und zu anderen Organen, in denen der Anteil der membran-gebundenen Polyribosomen an der gesamten, zellulären Polyribosomenpopulation 70-90% beträgt (Blobel and Potter 1967, Ramsey and Steele 1976, 1977, Venkatesan and Steele 1975, Yap et al. 1977, Zähringer et al. 1977 a, b), liegt im Herzmuskel der überwiegende Teil der Polyribosomen in freier, nicht membran-gebundener Form vor (Hjalmarson et al. 1975, Meerson et al. 1974, Morgan et al. 1971 b, Zak et al. 1967). Dieser Befund wird dadurch erklärt, daß im Herzmuskel nur retinierte, jedoch keine sezernierten Proteine synthetisiert werden, da nach heutiger Anschauung die membrangebundenen Polyribosomen der Ort der Synthese sezernierter Proteine sind, in der Zelle retinierte Proteine dagegen von freien Polyribosomen synthetisiert werden (Redman 1969, Rothschild et al. 1977, Shore and Tata 1977, Zähringer et al. 1977 a, b, 1979 b).

Von Narayanan and Eapen (1973 a, b) und anderen Autoren (Übersicht bei Zähringer 1979 b) wurde postuliert, daß ein erheblicher Prozentsatz der myokardialen Proteine durch Polyribosomen synthetisiert wird, die eng an myofibrilläre Strukturen gebunden sind. Dadurch würde die Synthese der kontraktilen Proteine, insbesondere von Myosin, in enger, struktureller Nachbarschaft zur späteren, intrazellulären Lokalisation dieser Proteine stattfinden (Etlinger et al. 1975, Griffin et al. 1971, Hagopian et al. 1975, Narayanan and Eapen 1973 a, b, Williams and Goldspink 1971).

Dieser Ansicht wird durch Untersuchungen von Zak et al. (1967) widersprochen, die in sorgfältigen Studien über die subzelluläre Verteilung von myokardialer RNS und Ribosomen keinen Anhalt für einen speziellen, myofibrillären RNS-Pool fanden.

Weiterhin ist ungeklärt, ob im Myokard ähnlich wie in der Leber (Zähringer et al. 1976 a, b, 1979 b) und wie in anderen Organen (Übersicht bei Zähringer et al. 1976 b) ein Pool nicht-translatierter mRNS im Zytosol existiert, der bei Bedarf zur Steigerung der myokardialen Proteinsynthese herangezogen werden könnte.

Die Beeinflussung der myokardialen Proteinsynthese durch stimulierende bzw. inhibierende Faktoren wird ausführlich in einer Übersicht von Zähringer (1979 b) besprochen.

Über Genexpression, Transkription von DNS in HnRNS und die Bildung von mRNS aus HnRNS ist am Herzmuskel bisher noch nichts bekannt.

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist, einige der wesentlichen molekularbiologischen Untersuchungsmethoden, die ein Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Genexpression an anderen Organen ermöglicht hatten, so zu modifizieren, daß sie trotz der bestehenden Schwierigkeiten am Herzmuskel anwendbar würden. Dies würde einen generell neuen Ansatzpunkt für die Erforschung der Regulationsmechanismen myokardialer Genexpression ermöglichen, letztlich unter der Zielvorstellung, daß durch molekularbiologische Untersuchungsmethoden zukünftig ein besseres Verständnis der Pathogenese bislang ungeklärter Herzmuskelerkrankungen erreichbar sein wird.

1.3. Untersuchungsziele

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die Isolierung, Charakterisierung und zellfreie Translation myokardialer Polyribosomen und mRNS, sowie Untersuchungen zur Verteilung von Gesamt-RNS, Polyribosomen und mRNS in den verschiedenen, subzellulären Kompartments der Myokardzelle. Hierdurch soll geklärt werden, ob eine solche Verteilung eine potentielle Rolle bei der Regulation der myokardialen Proteinsynthese spielt.

Folgende Untersuchungsziele stehen im Vordergrund:

1. Isolierung und Charakterisierung myokardialer Polyribosomen und mRNS

   Hierzu werden zur Verfügung stehende Methoden zur Isolierung von Polyribosomen (Übersicht bei Zähringer et al. 1977 a) und von mRNS (Übersicht bei Brawerman 1974, Taylor 1979), die an anderen Organen erfolgreich eingesetzt worden sind, so modifiziert, daß sie am Herzmuskel trotz der bestehenden Schwierigkeiten (vgl. Kap. 1.2.) einsetzbar werden, und die Isolierung intakter, myokardialer Polyribosomen und mRNS in hoher Ausbeute ermöglichen.

   Im Rahmen der Charakterisierung isolierter, myokardialer Polyribosomen und mRNS wird sodann

   a) ihre strukturelle Integrität durch Analyse des Sedimentationsverhaltens auf Sucrose-Gradienten nachgewiesen

   b) ihre funktionelle Integrität durch Bestimmung der Proteinsynthetisierenden Aktivität in zellfreien Systemen belegt mit anschließender Identifizierung der Translationsprodukte durch elektrophoretische Auftrennung und Vergleich mit den wichtigsten, aus nativem Herzmuskel extrahierten, myofibrillären Proteinen.

2. Chemische Isolierung von zellfrei synthetisiertem Aktin

Da die Übereinstimmung im Molekulargewicht zwischen einem zellfrei synthetisierten Protein und dem entsprechenden aus nativem Untersuchungsmaterial extrahierten Protein zwar ein bedeutsamer Hinweis für eine korrekte in-vitro Synthese ist, aber nicht unbedingt einen Beweis für ihre Identität darstellt, wird am Beispiel von neusynthetisiertem Aktin eine chemische Isolierung aus zellfreien Translationsansätzen myokardialer mRNS durchgeführt. Die chemische Isolierung basiert auf der funktionellen Eigenschaft von Aktin zur Salz-abhängigen reversiblen Polymerisation und dient

a) als weiterer Beleg für eine korrekte zellfreie Translation im Rahmen der Aktivitätsprüfung myokardialer mRNS

b) zur Quantifizierung des Gehalts myokardialer mRNS-Präparationen an spezifischer Aktin-mRNS unter der Voraussetzung, daß die Translation aller mRNS-Moleküle im zellfreien System mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft (Bag and Sarkar 1975, Lodish and Jacobson 1972, Palmiter 1973)

c) zur Quantifizierung von weiteren, myokardialen mRNS-Spezies im Zusammenhang mit der Bestimmung der Menge der von ihnen zellfrei synthetisierten Proteine.

3. Untersuchung der subzellulären Verteilung myokardialer Polyribosomen, Gesamt-RNS und mRNS

Hier wird untersucht, ob auch im Herzmuskel eine charakteristische Verteilung dieser Substanzen zwischen den verschiedenen, subzellulären Kompartments besteht, und wenn ja, in welchem Ausmaß und ob eine solche Verteilung eine potentielle Rolle bei der Regulation der myokardialen Proteinsynthese spielt.

Dabei dient

a) der Vergleich der zellfrei synthetisierten Translationsprodukte von mRNS-Präparationen aus Zellkernen, Mikrosomen, Myofibrillen und post-mikrosomalem Überstand (Zellsaft) der Klärung der funktionellen Rolle dieser intrazellulären Kom-

partments bei der Regulation der myokardialen Proteinsynthese, sowie der Untersuchung etwaiger Präferenzen für die Synthese einzelner, spezifischer, myokardialer Proteine

b) die zellfreie Translation von mRNS-Präparationen aus Myofibrillen insbesondere der Untersuchung der Hypothese, ob die Myofibrillen eine wesentliche Rolle bei der Synthese ihrer eigenen Proteine spielen, wie von Narayanan and Eapen (1973 a, b) und anderen Autoren (vgl. Kap. 1.2.) postuliert wurde, im Gegensatz zu Zak et al. (1967), die keinen Anhalt für einen speziellen, myofibrillären RNS-Pool fanden

c) die zellfreie Translation von mRNS-Präparationen aus dem post-mikrosomalen Überstand (Zellsaft) insbesondere der Klärung der Frage, ob im Myokard, ähnlich wie in anderen Organen (Übersicht bei Zähringer et al. 1976 a, b) ein Pool funktionsfähiger nicht-translatierter mRNS besteht.

2. METHODEN

2.1. Tiermaterial

Als Untersuchungsmaterial wurde der Herzmuskel männlicher Sprague-Dawley Ratten (150 g Körpergewicht, 45 Tage alt) verwendet. Zur Tierfütterung diente Altromin-Ratten-Standard-Diät (Fa. Altromin, 491 Lage-Lippe, Langestr. 40) und Leitungswasser ad libitum. Weibliche New Zealand Kaninchen (2.5 kg Körpergewicht, 6-8 Wochen alt) dienten zur Gewinnung von Retikulozyten.

2.2. Chemikalien

Alle verwandten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. Nuklease aus Staphylococcus aureus (micrococcal nuclease) wurde von Boehringer, Mannheim bezogen. L-Leucin (4,5-^{3}H(N)), SA 30-50 Ci/mmol

und L-Metionin (^{35}S), SA 835 Ci/mmol, wurden von New England Nuclear, 6072 Dreieich, gekauft. Die ^{14}C-markierten Standardproteine (Myosin, Phosphorylase b, Albumin, Ovalbumin, Carbonic Anhydrase, Lysozym), SA 8-36 uCi/mg Protein, wurden von Amersham Radiochemical Centre, 33 Braunschweig, Gieselweg 1, erhalten. Die Röntgenfilme für die Fluorographie (Kodak X-Omat R Film (XR-5)) wurden von Kodak, Rochester, USA, gekauft (Vertrieb durch Fa. Weisser, 8 München 2, Grimmstr. 2).

2.3. Isolierung von Polyribosomen und mRNS aus Herzmuskel

Polyribosomen:

Zur Gewinnung von Polyribosomen wurden jeweils 10 Rattenherzen gepoolt, in kleine Stückchen geschnitten und in 8 Vol. 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 250 mM Sucrose und 1% Triton-X-100 homogenisiert (Kombination aus Ultra-Turrax (2x5 Sek., 20 000 UpM) und Potter-Elvehjem Homogenisator (3 strokes, 2 000 UpM)). Der PMS (12 500 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, 4°C) wird auf eine DOC-Konzentration von 1% gebracht und durch einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten (0.5 M/2 M Sucrose in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 500 mM NH_4Cl) zentrifugiert (28 000 UpM, 16-20 Std., Rotor 30, 4°C). Das erhaltene, klare Polyribosomenpellet wird behutsam in 50-100 ul 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT gelöst und bei -80°C aufbewahrt (kein nennenswerter Aktivitätsverlust über Monate/Jahre). Die Konzentration der Polyribosomen wird bestimmt durch Messung der OD_{260nm} unter Verwendung eines Konversionsfaktors von 1 OD_{260nm} = 66 ug Ribosomen/ml (Baliga et al. 1968).

mRNS:

Zur Gewinnung von mRNS aus Herzmuskel wurden jeweils 8-25 Rattenherzen gepoolt. Nach Homogenisation (Kombination aus Ultra-Turrax (2x10 Sek., 20 000 UpM) und Potter-Elvehjem Homogenisator (3 strokes, 2 000 UpM)) in 8 Vol. 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$,

250 mM Sucrose, 1% Triton-X-100 und 100 U/ml Heparin, wird der PMS durch Zentrifugation erhalten (12 500 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, 4°C), anschließend zur Gewinnung der Mikrosomen durch ein Sucrosekissen (2 ml 1.4 M Sucrose in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 500 mM NH_4Cl) zentrifugiert (50 000 UpM, 2 Std., Ti 60 Rotor, 4°C). Alternativ kann der PMS auch direkt zentrifugiert werden (42 000 UpM, 70 Min., Ti 60 Rotor, 4°C). Die pelletierten Mikrosomen werden in 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 U/ml Heparin, 0.1% SDS (ca. 3-faches Vol. des Gewichts der eingesetzten Herzen) suspendiert, dann unter Rühren auf eine SDS-Konzentration von 1% gebracht.

Zur Phenolextraktion (Aviv and Leder 1972) der mikrosomalen RNS wird unter Zugabe von 1 Vol. pH 8.3-puffergesättigter Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (50/50/1, v/v/v) 15 Min. bei Raumtemperatur gerührt und die RNS-haltige wässrige Phase von der Phenolphase durch Zentrifugation (10 000 UpM, 15 Min., SS 34 Rotor, 20°C) getrennt. Die wässrige Phase wird noch zweimal durch Zugabe von 1/2-1 Vol. puffergesättigter Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung extrahiert. Durch Zugabe von 2 Vol. Äthanol läßt man die mikrosomale RNS in Gegenwart von 2% Kalium-Azetat (pH 5.5) über Nacht bei -20°C präzipitieren.

Nach dem Fällen wird die mikrosomale RNS pelletiert (13 000 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, -20°C) und 2x mit 0.2 M NaCl/Äthanol (1:2, v/v, -20°C) gewaschen. Die letzte pelletierte mikrosomale RNS wird in 10-20 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl aufgelöst (10-15 OD_{260nm}/ml). Nach kurzem Erhitzen (3-5 Min., 58°C) zur Auflösung von RNS-Aggregaten (Bantle et al. 1976 b, Taylor 1979) und rascher Abkühlung auf Raumtemperatur wird die in der Gesamt-RNS enthaltene, Poly(A)-reiche mRNS durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose erhalten (Aviv and Leder 1972, Faust et al. 1973, Gilham 1964). Dazu wird eine Oligo(dT)-Säule mit 0.5 g Oligo(dT)-Cellulose erstellt, die mit Hochsalzpuffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl) gewaschen wird. Die mikrosomale RNS wird auf die Säule aufgetragen und bei einer langsamen Flußrate von ca. 10 ml/Std. wird die nicht adsorbierte non-Poly(A)-RNS gesammelt. Die Oligo(dT)-Säule wird

sequentiell mit 30 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl und 30 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.15 M KCl gewaschen. Die adsorbierte Poly(A)-enthaltende mRNS wird mit 2.5 ml 1 mM Hepes, pH 7.0 eluiert, indem die K^+-Konzentration auf Null erniedrigt wird.

Die Konzentration einer Lösung von Gesamt-RNS oder mRNS wird durch Messung ihrer optischen Dichte bei 260 nm in einem Gilford Spectrophotometer bestimmt ($OD_{260\ nm}(1\%) = 250$) (Driscoll et al. 1978). Die mRNS kann ohne Aktivitätsverlust über Monate/Jahre bei -80°C aufbewahrt werden.

2.4. Isolierung von Polyribosomen und mRNS aus Leber

Methoden zur Isolierung von Polyribosomen und mRNS aus Rattenleber sind ausführlich beschrieben worden (Zähringer et al. 1975 a, 1976 a-c, 1977 b, 1979 a, 1981 a).

Zur Gewinnung von Polyribosomen werden 10 gepoolte Rattenlebern im Unterschied zu Herzmuskel in 2 Vol. 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 250 mM Sucrose, 0.1 mM EDTA, 150 ug/ml Heparin homogenisiert (Potter-Elvehjem Homogenisator, 3 strokes, 2 000 UpM). Der PMS (12 500 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, 4°C) wird zur Entfernung von Lipoproteinen und anderen Lipiden durch Glaswolle filtriert. Ansonsten ist das Vorgehen analog zur beschriebenen Gewinnung von Herzmuskel-Polyribosomen (vgl. Kap. 2.3.).

Zur Gewinnung von mRNS werden 10 gepoolte Rattenlebern im Unterschied zu Herzmuskel in 2 Vol. 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 250 mM Sucrose, 150 ug/ml Heparin homogenisiert (Potter-Elvehjem Homogenisator, 3 strokes, 2 000 UpM). Der PMS (12 500 UpM, 20 min., SS 34 Rotor, 4°C) wird durch Glaswolle filtriert und zentrifugiert (42 000 UpM, 50-70 Min., Ti 50.1 Rotor, 4°C). Die mikrosomalen Pellets werden in 100 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA und 50 ug/ml Heparin suspendiert und dann auf eine SDS-Konzentration von 1% gebracht. Der pH wird mit 1 N NaOH auf 9.0 eingestellt und die Phenolextraktion wird ausgeführt wie beschrieben (Aviv and Leder 1972). Die erhaltene mikrosomale RNS wird in 150 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 500 mM KCl aufgelöst.

Nach kurzem Erhitzen auf 58°C (3-5 Min.) wird die Poly(A)-enthaltende mRNS durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose gewonnen wie bei der Präparation myokardialer mRNS beschrieben (vgl. Kap. 2.3.).

2.5. Isolierung von pH 5 Enzymen aus Herzmuskel und Leber

Die pH 5 Enzymfraktion wurde aus Rattenleber und Rattenherzmuskel entsprechend der Methode von Baliga et al. (1968) isoliert. Jeweils ca. 5 g Gewebe wird in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 250 mM Sucrose homogenisiert. Der PMS (12 500 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, 4°C) wird zentrifugiert (40 000 UpM, 2 Std., Ti 50.1 Rotor, 4°C), der erhaltene post-ribosomale Überstand durch Sephadex-G25 passiert. Die rötlichen Fraktionen werden gesammelt, gepoolt und mit 1 N CH_3COOH auf pH 5.2 gebracht (20 Min., 4°C). Das Präzipitat wird durch Zentrifugation (10 000 UpM, 10 Min., SS 34 Rotor, 4°C) gesammelt und in 1 ml 50 mM Hepes, pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 10 mM DTT suspendiert und bei -40°C (bis -80°C) aufbewahrt.

2.6. Sedimentationsanalyse von Polyribosomen, mikrosomaler RNS und mRNS auf Sucrose-Gradienten

Polyribosomen:

100-200 ug Polyribosomen wurden auf kontinuierlichen Sucrose-Gradienten gelagert (10-40% Sucrose in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$) und zentrifugiert (42 000 UpM, 70 Min., SW 50.1 Rotor, 4°C). Das Sedimentationsverhalten wurde in einem Gilford Recording Spectrophotometer bei 260 nm gemessen, indem die Gradienten mit 2 M Sucrose unterlagert wurden und durch eine Flußzelle im Gilford Spectrophotometer mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit (Peristaltische Pumpe) durchgepumpt wurden.

Mikrosomale RNS:

50-100 ug mikrosomaler RNS wurden auf kontinuierlichen Sucrose-

Gradienten gelagert (5-40% Sucrose in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA) und zentrifugiert (45 000 UpM, 5 Std., SW 50.1 Rotor, 4°C). Das Sedimentationsverhalten wurde bei 260 nm registriert, wie bei den Polyribosomen beschrieben.

mRNS:

20-50 ug mRNS wurden auf kontinuierlichen Sucrose-Gradienten hinsichtlich ihres Sedimentationsverhaltens analysiert, wie bei der mikrosomalen RNS beschrieben. Als Puffer wurde z.Tl. auch 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS gewählt, da hierunter generell weniger RNS-Aggregat-Bildung beobachtet wurde.

2.7. Präparation der zellfreien Systeme (Weizenkeimsystem und mRNS-abhängiges Retikulozyten-Lysat-System)

Weizenkeimsystem:

Die 30 000 g Überstandsfraktion (S_{30}) von Weizenkeimen wurde gewonnen wie von Roberts and Paterson (1973) beschrieben und in Zusammenarbeit mit Herrn cand. med. W. Raum hergestellt. Als einzige Modifikation wurde auf eine Präinkubation des Weizenkeim-S_{30} vor der Passage durch Sephadex-G 25 verzichtet. Die Weizenkeime (ungeröstet) wurden von der Firma Keimdiät, 89 Augsburg, kostenlos zur Verfügung gestellt.

6 g ungeröstete Weizenkeime und 6 g Seesand werden ca. 60 Sek. in einem Mörser kräftig verrieben (alle Arbeitsschritte bei 4°C). Nach Zugabe von 10 ml 20 mM Hepes, pH 7.6, 100 mM KCl, 1 mM Mg-Azetat, 2 mM $CaCl_2$, 6 mM 2-Merkapto-Äthanol werden die Weizenkeime nochmals für 20-30 Sek. kräftig verrieben und zentrifugiert (16 000 UpM, 10 Min., SS 34 Rotor, 4°C). Der Überstand wird durch Glaswolle filtriert, auf eine Sephadex-G25 Säule aufgetragen und mit 20 mM Hepes, pH 7.6, 120 mM KCl, 5 mM Mg-Azetat, 6 mM 2-Merkapto-Äthanol bei einer Flußrate von 1 ml/Min. eluiert. Die trüben Fraktionen (Weizenkeim-S_{30}) werden gepoolt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

mRNS-abhängiges Retikulozyten-Lysat-System:

Zur Gewinnung von Retikulozyten-Lysat (Darnbrough et al. 1973, Gilbert and Anderson 1970, 1971, Hunt and Jackson 1974, Palmiter 1973, Villa-Komaroff et al. 1974) wurden jeweils 2 weibliche New Zealand Kaninchen (2.5 kg Körpergewicht, 6-8 Wochen alt) durch subkutane Injektion von 2.5 ml Acetylphenylhydrazin (1.25% w/v) an 4 konsekutiven Tagen anämisiert. Am 9. Tag werden die Kaninchen mit 1.5 ml Pentobarbital (50 mg/ml) durch Injektion in die Ohrvene narkotisiert. Gleichzeitig wird Heparin (1.5 ml, 250 U/ml) gegeben. Ca. 80 ml Blut pro Kaninchen werden unmittelbar in einem Vol. eiskalter Salzlösung (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 7.5 mM $MgCl_2$) gesammelt, durch 2 Lagen boneline filtriert und zentrifugiert (3 500 UpM, 5 Min., SS 34 Rotor, 4°C). Die pelletierten Zellen werden 3x behutsam in 3 Vol. Salzlösung gewaschen, die letzte Zentrifugation wird bei 7 000 UpM durchgeführt. Das erhaltene Pellet wird in einem Vol. eiskaltem Wasser unter Rühren lysiert und nach einer Min. bei 15 000 UpM für 20 Min. bei 4°C in einem SS 34 Rotor zentrifugiert. Der erhaltene Überstand (Retikulozyten-Lysat) wird in Aliquote von 1 ml aufgeteilt und bei -80°C aufbewahrt.

Das mRNS-abhängige Retikulozyten-Lysat-System wurde entsprechend dem Vorgehen von Pelham and Jackson (1976) durch Inaktivierung der endogenen mRNS mittels Kalzium-aktivierter Nuklease hergestellt: 1 ml mit Hämin (25 uM), Creatin-Kinase (50 ug/ml), Creatinphosphat (10 mM), KCl (100 mM), $MgCl_2$ (0.5 mM) und Aminosäurengemisch (minus Methionin 20-30 uM) supplementiertes Retikulozyten-Lysat wird auf eine Konzentration von 1 mM $CaCl_2$ (0.1 M $CaCl_2$-Stocklösung) und 150 U Nuklease/ml (1 mg Nuklease (15 000 U/mg)/ml H_2O-Stocklösung) gebracht. Nach gründlichem Mischen wird bei 20°C 15 Min. im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 1 M EGTA (mit KOH neutralisiert) wird das Lysat auf eine Konzentration von 2 mM EGTA gebracht und somit die Reaktion gestoppt. Nach gründlichem Mischen werden 100 ul Aliquote bei -80°C aufbewahrt.

Anmerkung zu den Reagentien:
1. Acetylphenylhydrazin-Lösung: 1.25 g Acetylphenylhydrazin werden in 100 ml abgekochtem Aqua bidest. aufgelöst. Der pH wird mit 1 N

NaOH auf 7.0 eingestellt. Zur weiteren Entfernung von O_2 wird die Lösung für 3 Min. mit N_2 durchströmt. Aliquote sind bei -20°C über Monate stabil.
2. Hämin-Lösung: 13 mg Hamin werden in 0.5 ml 1 N KOH, 0.2 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.8 und 17.8 ml 90% Äthylenglykol gelöst. Unter starkem Rühren wird mit 1 N HCl der pH auf 7.8 eingestellt. Durch Auffüllen mit H_2O werden 20 ml 1 mM Hämin-Lösung erhalten. Es werden Aliquote von 100 ul gebildet und bei -20°C aufbewahrt.

2.8. In-vitro Translation von Polyribosomen und mRNS in zellfreien Systemen

Polyribosomen:

Die zellfreie Translation der Polyribosomen aus Herzmuskel und Leber erfolgte bei 37°C für 60 Min. in Reaktionsassays von 25 ul in Gegenwart von 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM $MgCl_2$, 80 mM NH_4Cl, 2 mM ATP, 0.2 mM GTP, 2 mM DTT, 2 ul ^{3}H-Leucin (SA 30-50 Ci/mmol) und 5 ul pH 5 Enzyme (Zähringer et al. 1977 b, 1980 b, 1981 a). Die Inkorporation von ^{3}H-Leucin in Gesamtprotein wurde in einer Modifikation der von Mans and Novelli (1961) beschriebenen Methode bestimmt: 5 ul des Assays wurden am Ende der Inkubation auf Whatmann 3MM Papierscheibchen aufgetragen (2.4 cm im Durchmesser). Die Scheibchen wurden sequentiell mit 10% TES (10 Min., 4°C), 5% TES (5 Min., 4°C), 5% TES (10 Min., 90°C), 5% TES (1 Min., Raumtemperatur (RT)), Äther/Äthanol (1:1, v/v, 1 Min., RT), Äther/Äthanol (1 Min., RT) und Äther (1 Min., RT) gewaschen und anschließend für 15 Min. unter einer Infrarot-Lampe getrocknet. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in 10 ml Toluol/PPO/POPOP in einem Packard BF 5000 Liquid Szintillationszähler. Die Zähleffizienz (^{3}H-Leucin) betrug 36%.

mRNS:

Die zellfreie Translation der mRNS erfolgte im Weizenkeimsystem (Roberts and Paterson 1973) und im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Pelham and Jackson 1976). Die optimale Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem erforderte bei 120 Min., 25°C

in einem Assay-Volumen von 25 ul folgende Bedingungen: 28 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM Kalium-Azetat, 2.4 mM Magnesium-Azetat, 0.8 mM ATP, 0.2 mM GTP, 2 mM DTT, 8 mM Creatinphosphat, 10 ug/ml Creatinphosphokinase, 20-30 uM Aminosäurenmischung (minus Leucin bzw. minus Methionin), 3.2 uM ^{3}H-Leucin oder 3.2 uM ^{35}S-Methionin, 50 uM Spermin, 200 uM Spermidin, 5 ul Weizenkeim-S_{30} und 0.5-1.0 ug mRNS. Die Inkorporation von Radioaktivität in Gesamtprotein wurde entsprechend der Methode von Mans and Novelli (1961) bestimmt, wie bei den Polyribosomen beschrieben.

Die Inkubationsbedingungen zur zellfreien Translation von mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System waren analog der von Pelham and Jackson (1976) beschriebenen Bedingungen unter Verwendung von 4 uM ^{35}S-Methionin und 0.25-2 ug mRNS/25 ul Assay. Die Inkorporation von Radioaktivität in Gesamtprotein wurde entsprechend der Methode von Mans and Novelli (1961) bestimmt. Zusätzlich wurden die Proben vor der Äthanol/Äther-Waschung in einer Lösung von 5% TES, 98% Ameisensäure, 30% H_2O_2 (2:1:1, v/v/v) entfärbt.

2.9. Identifizierung der zellfrei synthetisierten Proteine

Am Ende der zellfreien Inkubationen wurden 1-5 ul Aliquote zur Bestimmung der Radioaktivitätsinkorporation in Gesamtprotein (Mans and Novelli 1961) verwandt, wie in Kap. 2.8. beschrieben. Zu einem weiteren 1 ul Aliquot wurden 25 ul 62 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% Glyzerin (v/v) und 5% 2-Merkapto-Äthanol gegeben. Nach Erhitzung (100°C, 3 Min.) wurde die Probe auf einem SDS-Polyacrylamid-Slabgel analysiert. 12.5% diskontinuierliche Gele (15 cm x 14 cm x 0.1 cm slabs) wurden als Trenngele verwendet und mit einem 3% Sammelgel überschichtet wie beschrieben (Maizel 1971). Die Gele wurden aus folgenden Lösungen hergestellt:

1. 12.5% Trenngel (20 ml): 8.87 ml H_2O, 2.5 ml 3 M Tris-Cl, pH 8.9, 0.2 ml 10% SDS, 8.32 ml Acrylamid : N,N'- Methylenbisacrylamid (30 : 0.8), 0.1 ml 10% Ammoniumpersulfat, 0.01 ml Temed.
2. 3% Sammelgel (5 ml): 3.77 ml H_2O, 0.625 ml 1 M Tris-Phosphat, pH 6.7, 0.05 ml 10% SDS, 0.5 ml Acrylamid : N,N'- Methylenbisacrylamid (30 : 0.8), 0.05 ml 10% Ammoniumpersulfat, 0.0025 ml Temed.

Ferner wurden 10-15% Gradienten-Gele verwendet wie beschrieben (Maizel 1971). 12 mM Tris, pH 8.3, 95 mM Glycin, 0.1% SDS diente als Elektrophorese-Puffer. Elektrophorese war bei 180 V für 4 1/2 Stunden.

Folgende, radioaktive und nicht-radioaktive Standardproteine wurden zur Identifizierung der neusynthetisierten Proteine verwandt und routinemäßig auf den Gelen gleichzeitig mit-elektrophoresiert: Myosin, Aktin, Albumin, Ferritin, Ovalbumin, Tropomyosin, Troponin, Immunglobulin, Myoglobin, Carbonic Anhydrase, Lactoglobulin, Lysozym und Cytochrom c.

Myosin, Aktin, Tropomyosin und Troponin wurden aus Rattenherzmuskel isoliert (vgl. Kap. 2.10.). Albumin, nach der Methode von Schreiber et al. (1970, 1971) sowie Maeno et al. (1970) aus Rattenleber isoliert, und Ferritin, nach der Methode von Linder and Munro (1972) (vgl. auch Zähringer 1980 c) ebenfalls aus Rattenleber isoliert, standen routinemäßig zur Verfügung. Die übrigen Standardproteine waren käuflich erworben worden.

Nach Färben (1 Std. mit 0.2% Coomassie-Brilliant-Blue in 50% Methanol, 7% Eisessig (v/v)) und Entfärben (über Nacht in 5% Methanol, 7% Eisessig (v/v)) der Gele wurden sie zur Fluorographie vorbereitet wie von Bonner and Laskey (1974) beschrieben. Ein Kodak X-Omat R Film (XR-5) wurde als Film verwandt. Die Filme wurden bei -80°C für 1-7 Tage exponiert.

2.10. Isolierung von Standardproteinen aus Herzmuskel

Aktin:

Ein Aceton-Puder aus Herz- oder Skelettmuskel (Feuer et al. 1948, Katz and Hall 1963) dient als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Aktin und wurde extrahiert unter geringfügiger Modifikation des Vorgehens von Spudich and Watt (1971): 2 g Aceton-Puder werden in 20 ml 2 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM ATP, 0.5 mM 2-Merkapto-Äthanol, 0.2 mM $CaCl_2$ homogenisiert (Ultra-Turrax, 5 Sek., 20 000 UpM) und anschließend 30 Min. bei 4°C gerührt. Nach Filtration durch 2 Lagen boneline wird der Rückstand nochmals für 30 Min. extrahiert. Beide

Filtrate werden vereinigt und nach Zentrifugation (10 000 UpM, 1 Std., SS 34 Rotor, 4°C) wird der Überstand auf eine Konzentration von 50 mM KCl und 2 mM $MgCl_2$ gebracht. Man läßt das Aktin für 2 Std. bei 4°C polymerisieren und bringt anschließend die Lösung auf eine Konzentration von 0.6 M KCl. Nach 1 1/2 Std. behutsamen Rührens wird polymerisiertes F-Aktin durch Zentrifugieren (48 000 UpM, 2 Std., Ti 60 Rotor, 4°C) pelletiert, in 3 Vol. Depolymerisationsmedium (5 mM Hepes, pH 7.0, 0.2 mM ATP, 0.2 mM $CaCl_2$) suspendiert und unter starkem Rühren 3x24 Std. gegen 100 Vol. Depolymerisationsmedium dialysiert. G-Aktin wird durch Zentrifugation (48 000 UpM, 2 Std., Ti 60 Rotor, 4°C) geklärt und wandert auf 12.5% SDS-Polyacrylamid-Slabgelen als singuläre Bande mit einem MG von 42 000.

Tropomyosin:

Für die Isolierung von Tropomyosin aus Rattenherzmuskel wurden 2 Methoden mit entsprechend guten Ergebnissen verwendet: a) Die Prozedur von Greaser and Gergely (1971), die ursprünglich am Kaninchen Skelettmuskel beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird Tropomyosin als Nebenprodukt aus dem pH 4.6 Prazipitat im Rahmen der Isolierung von Troponin gewonnen (vgl. Troponin-Isolierung). b) Die Prozedur von Fenner et al. (1975) wie folgt: 23 Rattenherzen (10 g) wurden in kleine Stückchen geschnitten und in 25 ml 50 mM KH_2PO_4, pH 6.8, 1 mM EDTA, 10 mM $NaPP_i$, 1 mM DTT homogenisiert (Potter-Elvehjem Homogenisator, 10 strokes, 2 000 UpM) und zentrifugiert (8 500 UpM, 15 Min., SS 34 Rotor, 4°C). Dies wird 3x wiederholt. Das letzte Pellet wird 15 Min. in 50 ml 100 mM KH_2PO_4, pH 7.5, 300 mM KCl, 10 mM $NaPP_i$, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 50 mM K_2HPO_4 gerührt. Nach Zentrifugation (8 600 UpM, 15 Min., SS 34 Rotor, 4°C) wird der Überstand durch Glaswolle filtriert, 400 ml 2 mM EDTA zum Filtrat hinzugefügt und 30 Min. gerührt. Nach Zentrifugation (8 500 UpM, 15 Min., SS 34 Rotor, 4°C) wird das Pellet in 25 ml 50 mM $NaPP_i$, pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM ATP homogenisiert (Potter-Elvehjem Homogenisator, 10 strokes, 2 000 UpM) und für 10 Min. gerührt. Nach Zentrifugation (18 400 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, 4°C) enthält das Pellet angereichertes Myosin. Der Überstand wird einer Ammoniumsulfat-Fraktionierung unterzogen. Die Fraktion, die zwischen 42 und 60% $(NH_4)_2SO_4$-

Sättigung präzipitiert, wird gesammelt (15 000 UpM, 10 Min., SS 34 Rotor, 4°C) und in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM KCl, 1 mM DTT gelöst. Das erhaltene Tropomyosin wandert auf 12.5% SDS-Polyacrylamidslabgelen als 98% reines Tropomyosin (MG 36 000) mit ca. 2% kontaminierenden Myosin-Leicht-Ketten.

Myosin:

Myosin wurde im Rahmen der Tropomyosin-Isolierung gewonnen. Auf 12.5% SDS-Polyacrylamid-Slabgelen wurde die Myosin-H-Kette mit einem MG von 200 000, Myosin-L-Kette 1 und Myosin-L-Kette 2 mit einem MG von 25 000 bzw. 20 000 Dalton bestimmt.

Troponin:

Troponin wurde aus Rattenherzmuskel isoliert unter geringfügiger Modifikation der Prozedur von Greaser and Gergely (1971): 20 Rattenherzen (10.8 g) wurden gepoolt, in kleine Stuckchen geschnitten, in 20 ml 20 mM KCl, 1 mM $KHCO_3$, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.1 mM DTT, pH 7.9 (Puffer I) homogenisiert (Ultra-Turrax, 1 Sek., 20 000 UpM) und bei 4°C für 5 Min. gerührt. Nach Filtern durch 2 Lagen boneline wird der Rückstand 3x mit Puffer I gewaschen. Der letzte Rückstand wird 10 Min. in 20 ml Äthanol gerührt und anschließend durch boneline filtriert. Die Äthanol-Extraktion wird 2x wiederholt. Dann folgt eine 3 malige Waschung mit 20 ml Diäthyläther mit anschließender Trocknung bei Raumtemperatur (RT) für 2-3 Std.. Das getrocknete Muskel-Puder wird über Nacht bei RT mit 20 ml 25 mM Tris, pH 8.0, 1 M KCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 1 mM DTT (Puffer II) unter Rühren extrahiert. Nach Filtration wird die Extraktion in 10 ml Puffer II wiederholt. Beide Filtrate werden vereinigt, auf 4°C abgekühlt und einer Ammoniumsulfat-Fraktionierung unterzogen. Die Fraktion, die zwischen 40-60% präzipitiert wird gesammelt (15 000 UpM, 10 Min, SS 34 Rotor, 4°C), in 5 ml 5 mM Tris, pH 7.5, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.1 mM DTT (Puffer III) suspendiert und über Nacht bei 4°C gegen 100 Vol. Puffer III dialysiert. Danach wird die Lösung auf eine Konzentration von 1 m KCl gebracht, das Volumen wird mit Puffer II auf 10 ml aufgefüllt. Der pH wird mit 1 N HCl auf 4.6 gebracht, das präzipitierende Tropomyosin pelletiert (15 000 UpM,

10 Min., SS 34 Rotor, 4°C) und in 2 ml Puffer III suspendiert. Der pH des Überstandes wird mit 1 N KOH auf 6.7-7.0 eingestellt. Troponin präzipitiert bei einer $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung von 70%, wird pelletiert, in 1-2 ml Puffer III suspendiert und über Nacht gegen Puffer III dialysiert. Auf 12.5% SDS-Polyacrylamid-Slabgelen zeigt das isolierte Troponin 4 Banden: Troponin-T (MG 40 000), Troponin-I (MG 23 000), Troponin-C (MG 21 000) und eine weitere Bande bei 14 000 Dalton.

2.11. Chemische Isolierung von in-vitro synthetisiertem Aktin

Die chemische Isolierung von neusynthetisiertem Aktin erfolgte analog dem Vorgehen von Bag and Sarkar (1975), wie von diesen Autoren im Rahmen der Bestimmung von Aktin-mRNS im embryonalen Hühnchen-Skelettmuskel beschrieben: Zu jeweils 250 ul Reaktionsassays myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem bzw. mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System wurde nach Inkubation 3 mg hoch gereinigtes Carrier-G-Aktin (vgl. Kap. 2.10.) gegeben und mit Depolymerisationsmedium (5 mM Hepes, pH 7.0, 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM ATP) auf 2 ml aufgefüllt. Das Material wird über Nacht gegen 200 Vol. Polymerisationsmedium (5 mM Hepes, pH 7.0, 0.1 M KCl, 0.003 M $MgCl_2$) bei 4°C dialysiert. Danach wird das Volumen der Proben auf 2 ml mit Polymerisationsmedium aufgefüllt. Ribosomen und F-Aktin werden pelletiert (47 000 UpM, 2 Std., Ti 70 Rotor, 4°C), in 2 ml Depolymerisationsmedium suspendiert und über Nacht gegen 100 Vol. des gleichen Mediums bei 4°C dialysiert. Nach Pelletierung der Ribosomen (47 000 UpM, 2 Std., Ti 70 Rotor, 4°C) wird das geklärte G-Aktin einem weiteren Polymerisationszyklus unterzogen wie beschrieben. Nach Zentrifugation (47 000 UpM, 2 Std., Ti 70 Rotor, 4°C) wird das F-Aktin-Pellet (Carrier-Aktin und neusynthetisiertes Aktin) in 150 ul Depolymerisationsmedium suspendiert. Die Konzentration von Carrier-Aktin wird auf jeder Stufe der beschriebenen Reinigungsprozedur entsprechend der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Ca. 50-60% des eingesetzten Carrier-Aktins werden im letzten F-Aktin-Pellet wieder gefunden. Ferner wird zur Quantifizierung des neusynthetisierten Aktins auf den einzelnen Reinigungsstufen der Verlauf der Radioaktivität entsprechend der Methode von Mans and Novelli (1961) bestimmt. Chemisch isolier-

tes Aktin wurde anschließend auf 12.5% SDS-Polyacrylamid-Slabgelen elektrophoresiert und fluorographiert.

2.12. Subzelluläre Fraktionierung von Herzmuskel

Für die Fraktionierung von Herzmuskel in seine subzellulären Kompartments (Zak et al. 1967) wurden 15-20 Rattenherzen gepoolt und homogenisiert wie beschrieben (vgl. Kap. 2.3.). Nach Zentrifugation des Homogenats (2 700 UpM, 15 Min., SS 34 Rotor, 4°C) wurde das nukleäre/myofibrilläre Pellet in 35 mM Borsäure, pH 7.1, 25 mM KCl, suspendiert und zentrifugiert (2 300 UpM, 2 Min., SS 34 Rotor, 4°C), wodurch Zellkerne (Pellet) und Myofibrillen (Überstand) getrennt werden. Der Überstand der ersten Zentrifugation (2 700 UpM, 15 Min., SS 34 Rotor, 4°C) wurde erneut zentrifugiert (12 500 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, 4°C), um Mitochondrien (Pellet) und PMS (Überstand) zu trennen. Aus dem PMS wurden durch Zentrifugation (42 000 UpM, 70 Min., Ti 60 Rotor, 4°C) Mikrosomen als Pellet erhalten, der verbleibende Überstand ist der post-mikrosomale Überstand.

Die in den verschiedenen Fraktionen (Nuklei, Myofibrillen, Mitochondrien, PMS, Mikrosomen, post-mikrosomaler Überstand) enthaltenen Mengen an Gesamt-RNS, mRNS und Polyribosomen wurden entsprechend den in Kap. 2.3. beschriebenen Methoden isoliert, mit der Ausnahme, daß bei der Präparation von mRNS aus dem post-mikrosomalen Überstand Sarkosin anstelle von SDS verwandt wurde.

2.13. Verschiedenes

Protein wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Gesamt-RNS wurde in einigen Experimenten auch nach der Methode von Munro and Fleck (1966) direkt quantifiziert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung und Charakterisierung myokardialer Polyribosomen und mRNS

Um strukturell und funktionell intakte Polyribosomen und mRNS aus Herzmuskel in hoher Ausbeute zu gewinnen, war es notwendig, zur Verfügung stehende Methoden der Isolierung von Polyribosomen (Übersicht bei Zähringer et al. 1977 a) und von mRNS (Übersicht bei Brawerman 1974, Taylor 1979), wesentlich zu modifizieren.

Die Charakterisierung der isolierten, myokardialen Polyribosomen und mRNS erfolgte sodann

a) hinsichtlich ihrer strukturellen Integrität durch Analyse des Sedimentationsverhaltens auf Sucrose-Gradienten,
b) hinsichtlich ihrer funktionellen Integrität durch Bestimmung der Protein-synthetisierenden Aktivität in zellfreien Systemen mit anschließender Identifizierung der Translationsprodukte.

3.1.1. Isolierung myokardialer Polyribosomen

Bei der Übertragung von Standardmethoden zur Isolierung intakter Polyribosomen aus Rattenleber (Blobel and Potter 1967, Driscoll et al. 1978, Ramsey and Steele 1976, Zähringer et al. 1977 a, b) oder aus anderen Geweben (Baliga et al. 1976, Mechler and Vassalli 1975, Zähringer et al. 1977 a) auf den Herzmuskel, zeigte sich, daß die extrahierbare Menge myokardialer Polyribosomen unter diesen Bedingungen nicht nur niedrig war (100-400 ug/g Herz), sondern von Aufarbeitung zu Aufarbeitung auch erheblich variierte. Die so erhaltenen Polyribosomen zeigten bei Analyse auf Sucrose-Gradienten hohe Peaks im Bereich der Monoribosomen (80S) und Ribosomenuntereinheiten (60S und 40S), aber nur wenig Material im Bereich der schweren Polyribosomen. Ferner war ihre zellfreie, Protein-synthetisierende Aktivität im Vergleich zu Rattenleber-Polyribosomen gering, wenn sie in-vitro in Gegenwart von pH 5 Enzymen translatiert wurden. Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit den Resultaten anderer

Arbeitsgruppen (Hjalmarson et al. 1975, Koelbel et al. 1970, Meerson et al. 1974, Morgan et al. 1971 a, b), in denen ebenfalls starke Variationen der myokardialen Polyribosomen-Ausbeuten beobachtet worden waren (150-550 ug/g Herz), sowie große Differenzen hinsichtlich Struktur und Protein-synthetisierender Aktivität der isolierten Polyribosomen bestanden.

Die systematische Modifikation von Standardmethoden zur Isolierung intakter Polyribosomen, sodaß sie auf das Untersuchungsmaterial des Herzmuskels anwendbar würden, erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 2 dokumentiert den Einfluß verschiedener Homogenisationsbedingungen auf die extrahierbare Menge myokardialer Polyribosomen.

Als optimal erwies sich eine Gewebehomogenisation in Kombination von Ultra-Turrax (2x5 Sek., 20 000 UpM) und Potter-Elvehjem Homogenisator (3 strokes, 2 000 UpM). Während eine längere Homogenisation mit dem Ultra-Turrax (2x10 Sek.) die Polyribosomen-Ausbeute um 40% erniedrigte, ist eine unterschiedliche Intensität der Homogenisation mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator ohne wesentlichen Einfluß auf die myokardiale Polyribosomen-Ausbeute.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Heywood et al. (1967) für embryonalen Skelettmuskel, und von Srivastava (1969) für Erwachsenen-Skelettmuskel, zeigte sich eine starke Abhängigkeit der myokardialen Polyribosomen-Ausbeute von der Kalium-Konzentration des Homogenisationspuffers (Tabelle 2). Eine optimale Polyribosomenisolierung erforderte 250 mM Kalium im Homogenisationspuffer und somit das Zehnfache der Kalium-Konzentration, die bei der Polyribosomenisolierung aus Leber angewandt wird (Zähringer et al. 1977 a). Diese Beobachtung wird durch die Präzipitation von Myosin bei niedrigen Ionenkonzentrationen erklärbar (Pollard and Weihing 1974): Präzipitierendes Myosin führt zur Ko-Präzipitation eines mehr oder weniger großen Anteils der myokardialen Polyribosomen (Morgan et al. 1971 b). Bei einer Kalium-Konzentration von 250 mM bleibt Myosin dagegen löslich, eine unspezifische, verlustreiche Präzipitation von Polyribosomen wird dadurch verhindert.

Tabelle 2: Einfluß der Homogenisationsbedingungen auf den extrahierbaren, myokardialen Polyribosomengehalt.

Experimentelle Bedingung	Myokardialer Polyribosomengehalt (ug/g Herz)		(%)
1. Homogenisationsintensität [+]			
- 2x 5 Sek. Ultra-Turrax	865 ± 80	(14)	100
- 2x10 Sek. Ultra-Turrax	519 ± 91	(4)	60
- 3 "strokes" mit P.E. [++]	865 ± 80	(14)	100
- 2 "strokes" mit P.E. [++]	787 ±146	(3)	91
2. K^+- und Mg^{++}-Konzentration im Homogenisationspuffer			
- Kalium (mM) [•]			
0	42	(2)	5
25	132	(2)	14
50	231	(2)	23
150	519	(2)	57
250	915	(2)	100
500	470	(2)	51
- Magnesium (mM) [••]			
2.5	776	(2)	70
5	1108	(2)	100
10	749	(2)	68
3. Volumen des Homogenisationspuffers			
- 8x Herzgewicht	865 ± 80	(14)	100
- 4x Herzgewicht	568 ± 83	(7)	66
- 2x Herzgewicht	277 ±141	(4)	32
4. Triton-X-100 im Homogenisationspuffer			
- plus Triton-X-100 (1%)	865 ± 80	(14)	100
- minus Triton-X-100	662 ±105	(5)	76
5. Filtration des Homogenats durch Glaswolle			
- keine Filtration	865 ± 80	(14)	100
- Filtration	727 ± 78	(4)	84

[+] = Homogenisiert wurde stets in einer Kombination von Ultra-Turrax (20 000 UpM) und Potter-Elvehjem Homogenisator (2 000 UpM)
[++] = Potter-Elvehjem Homogenisator
[•] = in Gegenwart von 5 mM $MgCl_2$
[••] = in Gegenwart von 250 mM KCl

Bei allen Aufarbeitungen wurden 10 Rattenherzen gepoolt. Unter optimalen Bedingungen wurde ein Mittelwert von 865 +/- 80 ug Polyribosomen/g Herzmuskel erhalten (14 Aufarbeitungen).

Als optimale Magnesium-Konzentration ergab sich 5 mM (Tabelle 2), ähnlich wie bei der Isolierung von Leberpolyribosomen (Zähringer et al. 1977 b).

Als entscheidend erwies sich auch das Volumen des Homogenisationspuffers (relativ zum Herzgewicht). Während bei der Isolierung von Polyribosomen aus Leber das 2-2.5-fache des Lebergewichts als Volumen des Homogenisationspuffers verwandt wird (Zähringer et al. 1977 b), liegt bei myokardialen Polyribosomen-Präparationen das Optimum des Homogenisationspuffers beim 8-fachen Volumen relativ zum Herzgewicht (Tabelle 2). Hierunter stieg nicht nur die myokardiale Polyribosomen-Ausbeute erheblich an, es kam darüberhinaus auch zu einer wesentlichen Reduzierung der zuvor beobachteten, großen Variabilität der erhaltenen Polyribosomen-Ausbeute.

Die Verwendung von Triton-X-100 im Homogenisationspuffer, wie es im Falle der Isolierung von Rattenleberpolyribosomen verschiedentlich beschrieben wurde (Übersicht bei Zähringer et al. 1977 a), erwies sich auch am Herzmuskel als deutlicher Vorteil hinsichtlich der Erzielung hoher Polyribosomen-Ausbeuten (Tabelle 2). Die Filtration des Homogenats durch Glaswolle, die bei der Präparation von Leberpolyribosomen zur Entfernung von Lipoproteinen und anderen Lipiden durchgeführt wird, führt am Herzmuskel zu einer Abnahme der Polyribosomen-Ausbeute (Tabelle 2).

Die Benutzung weiterer Modifikationen, wie sie verschiedentlich entweder am Herzmuskel oder an anderen Organen durchgeführt worden waren, z.B $\pm$ Heparin, $\pm$ DOC, $\pm$ Sucrose, Hepes anstelle von Tris-HCl im Homogenisationspuffer, schnelles Einfrieren der Herzen in flüssigen Stickstoff, Benutzung des post-nukleären Überstandes für die Polyribosomen-Isolierung), erwies sich als entweder ungünstig oder zeigte zumindest keine weitere Verbesserung der erreichten Polyribosomen-Ausbeuten.

Unter Verwendung der optimierten Bedingungen zur Isolierung myokardialer Polyribosomen (vgl. auch Kap. 2.3.) betrug die durchschnittliche Polyribosomen-Ausbeute aus dem Herzmuskel 45 Tage alter Ratten 865 $\pm$ 80 ug Polyribosomen/g Herz. Dieser Wert liegt 50-500% höher als die bisher publizierten Werte und unterstreicht die Notwendigkeit einer sorgfältigen Standardisierung.

3.1.2. Isolierung myokardialer, mikrosomaler RNS und mRNS

Für die Isolierung myokardialer, Poly(A)-enthaltender mRNS wurden zur Gewinnung des PMS ähnliche Homogenisationsbedingungen eingehalten, wie sie bei der Isolierung myokardialer Polyribosomen als optimal erkannt worden waren. Abweichungen und nähere Details wurden ausführlich im Methodenteil (vgl. Kap. 2.3.) beschrieben.

Aus dem PMS wurden die myokardialen Mikrosomen gewonnen wie in Kap. 2.3. beschrieben. Mikrosomale RNS wurde durch eine Modifikation der von Aviv and Leder (1972) beschriebenen SDS-Phenol-Extraktions-Mehtode isoliert. 719 $\pm$ 70 ug mikrosomaler RNS wurden durchschnittlich aus 1 g Herzmuskel erhalten (Tabelle 3).

Mikrosomale mRNS wurde aus der mikrosomalen RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose erhalten (Aviv and Leder 1972). Die durchschnittliche Menge myokardialer mRNS, die aus 1 g Herzmuskel isoliert werden konnte, betrug 21.3 $\pm$ 4.5 ug (Tabelle 3). Metafora et al. (1980) haben am Skelettmuskel erwachsener Ratten ähnliche Werte für den Gehalt des Skelettmuskels an mRNS erhalten (26 ug/g Skelettmuskel).

Zähringer (1981 c) zeigte anhand von Hybridisierungsexperimenten myokardialer mRNS an (^{3}H)Poly(U), daß der eigentliche Gehalt an myokardialer mRNS 2-2.5 Mal höher liegt und mindestens 50 ug/g Herz beträgt. Die in Tabelle 3 aufgeführten Werte stellen somit diejenige Menge an myokardialer RNS und mRNS dar, die mittels der beschriebenen Methode (vgl. Kap. 2.3.) isoliert werden konnen.

Abb. 2 zeigt einen typischen Versuch, in dem mikrosomale Gesamt-RNS auf eine Säule von 0.5 g Oligo(dT)-Cellulose aufgetragen wurde und die adsorbierte mRNS in einem zweiten Schritt durch Erniedrigung des Kaliumgehalts im Elutionspuffer (auf 0 mM KCl) wieder eluiert wurde. Da von Untersuchungen an anderen Organen bekannt war (Kabat 1975, Taylor 1979, Wall et al. 1977), daß rRNS oft stark an mRNS gebunden ist, möglicherweise aufgrund kurzer komplementärer Nukleotidsequenzen der 18S rRNS und verschiedener, spezifischer mRNS (Efstratiadis 1977), wurde in einigen Experimenten, entsprechend

Tabelle 3. Extrahierbarer, myokardialer Gehalt an mikrosomaler RNS und mRNS

RNS	Myokardialer Gehalt (ug/g Herz)
Mikrosomale RNS	719 ± 70 (11)
mRNS	21.3 ± 4.5 (9)
Verhältnis: $\frac{\text{mRNS x 100}}{\text{mikrosomale RNS}}$	2.84

Mikrosomale RNS und mRNS wurde aus jeweils 10 gepoolten Rattenherzen isoliert wie beschrieben (Kap. 2.3.). 13.4% der so erhaltenen, aus Herzmuskel extrahierbaren mRNS-Menge sind kontaminierende rRNS, die stark an mRNS gebunden ist (Kabat 1975) (vgl. Abb. 2). Zähringer (1981 c) zeigte anhand von Hybridisierungsexperimenten von myokardialer mRNS an (^{3}H)Poly(U), daß der eigentliche Gehalt an myokardialer mRNS 2-2.5 Mal höher liegt und mindestens 50 ug/g Herz beträgt. Somit können von der tatsächlich im Herzmuskel vorhandenen mRNS ca. 40-50% isoliert werden. Die aufgeführten Werte stellen somit diejenige Menge an myokardialer RNS und mRNS dar, die mit der beschriebenen Methode (Kap. 2.3.) isoliert werden können. Werte = $\bar{x} \pm$ SD (Anzahl der Aufarbeitungen).

den Vorschlägen anderer Autoren für Leber-mRNS (Sala-Trepat et al. 1978) und Gehirn-mRNS (Bantle et al. 1976 a, b), die eluierte myokardiale mRNS ein zweites Mal an Oligo(dT)-Cellulose adsorbiert. Abb. 2B zeigt, daß 13.4% der mRNS bei der zweiten Passage nicht retiniert werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um kontaminierende rRNS. Bei einer weiteren, dritten Passage der so erhaltenen, gereinigten mRNS über eine dritte Oligo(dT)-Cellulose-Säule wurde praktisch die gesamte, aufgetragene mRNS durch die Säule retiniert. Routinemäßig wurde auf eine völlige Entfernung der geringen rRNS-Kontaminierung verzichtet, da hierdurch die zellfreie Aktivität der mRNS nicht negativ beeinflußt wurde (vgl. Kabat 1975).

Bemerkenswert erscheint noch, daß bei Auslassen des Erwärmungsschritts der mikrosomalen RNS (58°C, 3 Min.) vor Applikation auf die Oligo(dT)-Cellulose-Säule, die an mRNS gebundene rRNS-Fraktion erheblich zunimmt. Ähnliche Beobachtungen wurden von McKnight and Schimke (1974) für Ovalbumin-mRNS mitgeteilt.

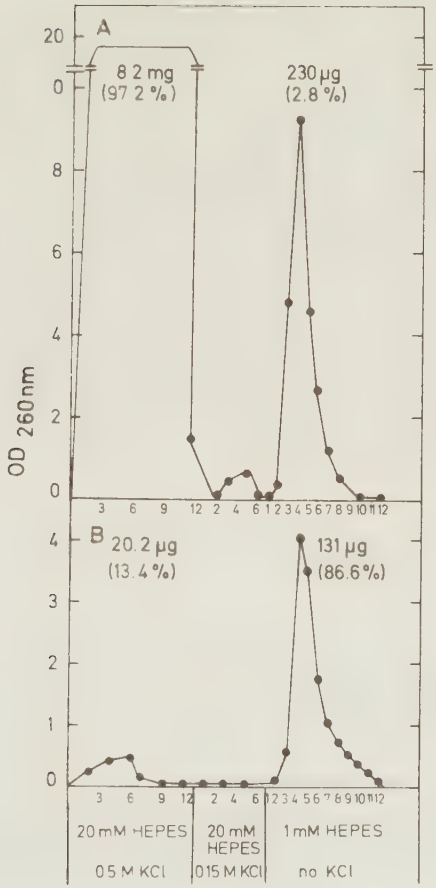


Abb. 2: Affinitätschromatographie myokardialer mRNS an Oligo(dT)-Cellulose.

211 OD(260nm) Einheiten mikrosomaler RNS in 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl (10.5 OD/ml) wurden nach Erhitzen (58°C, 3 Min.) und rascher Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) über eine 0.5 g Oligo(dT)-Cellulose Säule mit einer Flußrate von 10 ml/Std. passiert (A). Die Säule wurde sequentiell mit 30 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl und 35 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.15 M KCl gewaschen. Die adsorbierte mRNS wurde als spitzer Peak mit Elutionspuffer (1 mM Hepes, pH 7.0)

eluiert und in 250 ul Fraktionen gesammelt. 230 ug mRNS (2.8% der aufgetragenen mikrosomalen RNS) wurden erhalten. Da diese mRNS-Fraktion durch rRNS kontaminiert sein kann, die stark an mRNS gebunden ist (vgl. Text), und deshalb auch durch die Oligo(dT)-Cellulose retiniert wird, wurde eine zweite Passage über die Oligo(dT)-Cellulose Säule durchgeführt (B). Die mRNS-Fraktionen 3-7 (A) wurden gepoolt, mit 2 Vol. Äthanol (-20°C) präzipitiert (Rückgewinnung: 77% = 169 ug) und in 20 ul 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M KCl aufgenommen. Nach Zugabe von 180 ul DMSO und 20 ul gepuffertem 1.0 M LiCl (Bantle et al. 1976 b) wurde die Lösung auf 55°C (3 Min.) erhitzt, rasch auf RT abgekühlt und mit 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl verdünnt (10-fach). Dann erfolgte die zweite Passage über eine 0.5 g Oligo(dT)-Cellulose Säule (B). 131 ug mRNS (86.6%) wurden durch die Säule retiniert, 20.2 ug RNS (13.4%) passierten die Säule und sind sehr wahrscheinlich kontaminierende rRNS. Bei einer weiteren, dritten Passage der so erhaltenen, gereinigten mRNS über eine dritte Oligo(dT)-Cellulose Säule wurde praktisch die gesamte, aufgetragene mRNS durch die Säule retiniert.

3.1.3. Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens myokardialer Polyribosomen auf Sucrose-Gradienten

Die Analyse des Sedimentationsverhaltens von Polyribosomen auf kontinuierlichen Sucrose-Gradienten stellt eine bewährte Methode zur Beurteilung ihrer strukturellen Integrität dar (Blobel and Potter 1967 b, Mechler and Vassalli 1975, Wall et al. 1977, Zähringer et al. 1977 a, 1981 a).

Das Sedimentationsverhalten myokardialer Polyribosomen-Präparationen wurde auf kontinuierlichen Sucrose-Gradienten (10-40%) untersucht und mit dem Sedimentationsverhalten strukturell intakter Rattenleberpolyribosomen verglichen. Das Sedimentationsverhalten von Rattenleberpolyribosomen ist bekannt und wurde verschiedentlich dokumentiert (u.a. Baliga et al. 1968, Gamulin et al. 1972, Munro et al. 1975, Pronczuk et al. 1968, Ramsey and Steele 1976, Zähringer et al. 1977 a).

Abb. 3 zeigt, daß myokardiale Polyribosomen-Präparationen auf Sucrose-Gradienten praktisch das gleiche Sedimentationsverhalten aufweisen wie Polyribosomen aus Leber (für Lit. s.o.) und aus anderen Geweben (Baliga et al. 1976, Groner et al. 1977, Mechler and Vassalli 1975,

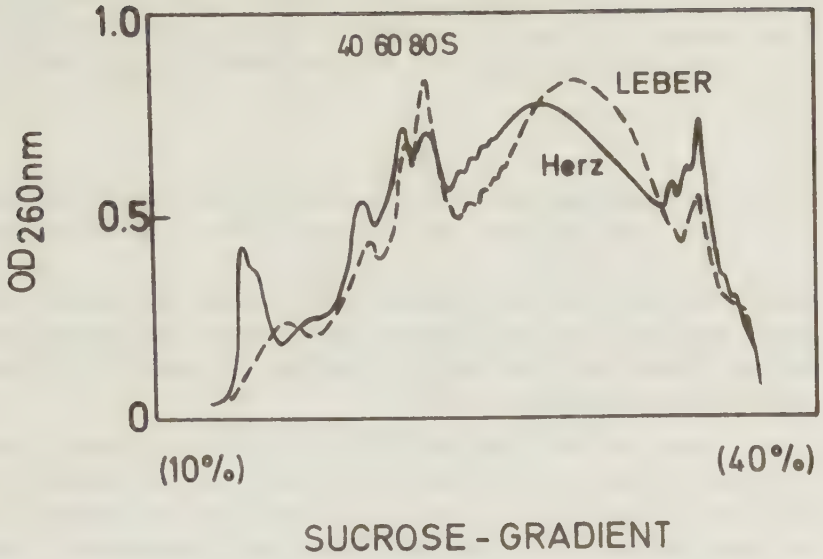


Abb. 3: Sedimentationsanalyse von Polyribosomen aus Rattenherz (——) und Rattenleber (----) auf kontinuierlichen, 10-40% Sucrose-Gradienten.

Die Isolierung von Polyribosomen aus Herz und Leber wurde in Kap. 2.3. und 2.4. beschrieben. Das Sedimentationsverhalten von jeweils 150 ug Polyribosomen wurde auf den Sucrose-Gradienten gemessen wie beschrieben (Kap. 2.6.). 40S, 60S und 80S beziehen sich auf das Sedimentationsverhalten von Ribosomenuntereinheiten bzw. Monoribosomen auf denselben Gradienten.

Wall et al. 1977).

Dieses Ergebnis legt nahe - wenn es auch nicht absolut beweisend ist -, daß die isolierten, myokardialen Polyribosomen strukturell weitgehend intakt sind. Eine geringe Degradation läßt sich nicht sicher ausschließen, wird durch die zusätzlichen Experimente jedoch sehr unwahrscheinlich (Kap. 3.1.5. und 3.1.7.)

Im Vergleich zu publizierten Sucrose-Gradienten verschiedener, anderer Präparationen myokardialer Polyribosomen (Hjalmarson et al.

1975, Meerson et al. 1974, Morgan et al. 1971 a, b) zeigten unsere Polyribosomen-Präparationen einen wesetlich höheren Anteil schwerer Polyribsomen (im Gegensatz zu Monoribosomen und Ribosomenuntereinheiten) als Ausdruck einer besser erhaltenen, strukturellen Integrität.

3.1.4. Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens der myokardialen, mikrosomalen RNS und mRNS auf Sucrose-Gradienten

Ähnlich wie im Falle der Polyribosomen stellt die Analyse des Sedimentationsverhaltens mikrosomaler RNS und mRNS auf kontinuierlichen Sucrose-Gradienten eine bewährte Methode zur Beurteilung ihrer strukturellen Integrität dar.

Abb. 4 zeigt eine Analyse des Sedimentationsverhaltens myokardialer, mikrosomaler RNS auf kontinuierlichen Sucrose-Gradienten (5-40%) im Vergleich zu mikrosomaler RNS aus Rattenleber. In Analogie zur mikrosomalen RNS aus Rattenleber zeigt auch myokardiale, mikrosomale RNS drei Peaks mit Sedimentationskoeffizienten von 4S (tRNS), 18S (rRNS der 40S Ribosomenuntereinheit) und 28S (rRNS der 60S Ribosomenuntereinheit). Dabei zeigte die relative Verteilung der drei RNS-Spezies stets ein starkes Überwiegen der rRNS-Peaks, ähnlich den Berichten anderer Autoren für Leber-RNS (Blobel and Potter 1967, Sala-Trepat et al. 1978) und RNS aus anderen Geweben (Mondal et al. 1974, Ouellette et al. 1976, Przybyla and Strohman 1974, Wall et al. 1977). Dies läßt vermuten, daß ähnlich wie in anderen Geweben der größte Teil der myokardialen tRNS nicht mit Mikrosomen assoziiert ist, sondern in freier Form (bzw. als Aminoacyl-tRNS) im Zellsaft, dem post-mikrosomalen Überstand vorliegt. Dies wird durch die Analyse des Sedimentationsverhaltens der post-mikrosomalen RNS auf Sucrose-Gradienten bestätigt (Abb. 5).

Abb. 6 zeigt die Analyse myokardialer mRNS auf kontinuierlichen Sucrose-Gradienten mit einem heterogeren Sedimentationsverhalten und einem breiten Sedimentationspeak von ca. 16-20S, der ähnlich wie in anderen Organen (Irwin et al. 1975, Ouellette et al 1976, Sala-Trepat et al. 1978, Wall et al. 1977) durch das Vorliegen von mRNS-

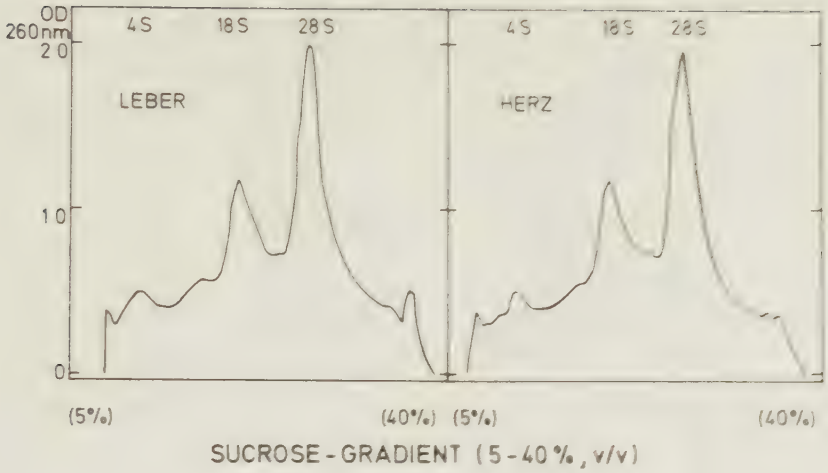


Abb. 4: Sedimentationsanalyse von mikrosomaler Gesamt-RNS aus Rattenleber und Rattenherz auf kontinuierlichen, 5-40% Sucrose-Gradienten.

Mikrosomale RNS aus Rattenleber und Rattenherz wurden durch Phenol-Extraktion pelletierter Mikrosomen isoliert wie beschrieben (Kap. 2.3., 2.4.). Im vorliegenden Fall wurden jeweils 100 ug mikrosomaler RNS auf kontinuierliche Sucrose-Gradienten (5-40%) aufgetragen und das Sedimentationsverhalten gemessen wie beschrieben (Kap. 2.6.). Die Bezeichnungen 4S, 18S und 28S beziehen sich auf RNS-Standards, die auf parallelen Sucrose-Gradienten analysiert wurden (4S = tRNS, 18S + 28S = rRNS).

Molekülen mit sehr unterschiedlichen Molekulargewichten bedingt sein dürfte. Der bei 28S zu sehende, kleine Peak, der sowohl bei der Analyse der Leber-mRNS als auch bei der Herzmuskel-mRNS zu sehen war (Abb. 6), wurde auch von anderen Autoren bei Hämoglobin-mRNS (Kabat 1975) und Myelomzellen-mRNS (Wall et al. 1977) beobachtet und repräsentiert rRNS, die fest an mRNS gebunden ist (vgl. Kap. 3.1.2.), möglicherweise aufgrund kurzer, komplementärer Nukleotid-

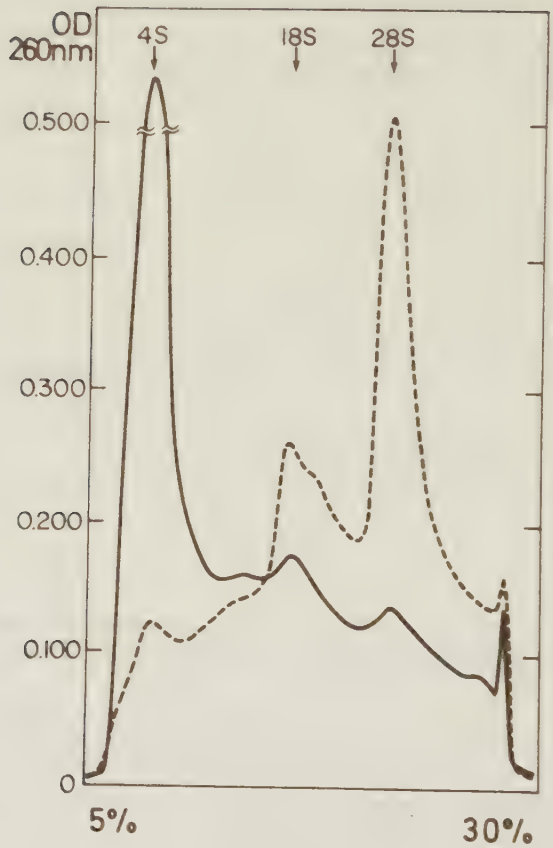


Abb. 5: Sedimentationsanalyse von myokardialer Gesamt-RNS aus der mikrosomalen (----) und post-mikrosomalen (——) Fraktion des Herzhomogenats auf kontinuierlichen, 5-30% Sucrose-Gradienten

Jeweils 50 ug mikrosomaler und post-mikrosomaler Gesamt-RNS des Herzhomogenats wurden auf kontinuierlichen, 5-30% Sucrose-Gradienten analysiert, wie im Methodenteil (Kap. 2.6.) beschrieben.

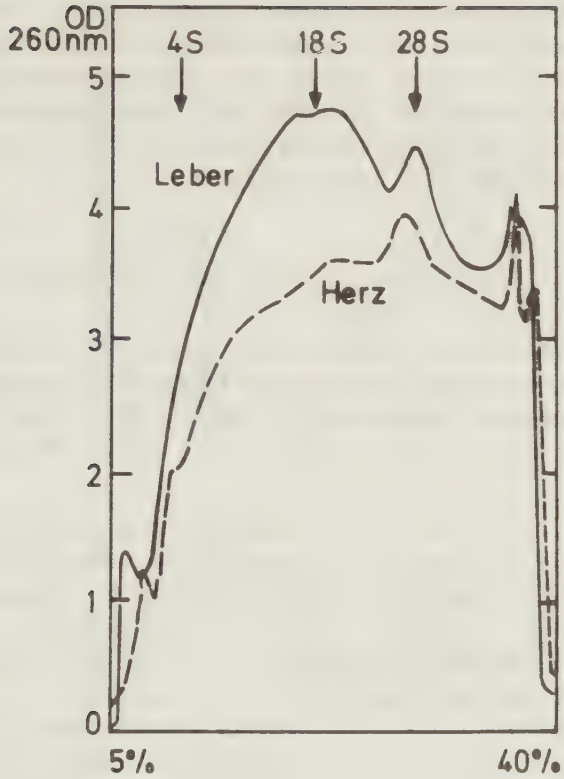


Abb. 6: Sedimentationsanalyse von mRNS aus Rattenherz (----) und Rattenleber (——) auf kontinuierlichen, 5-40% Sucrose-Gradienten.

mRNS aus Rattenleber und Rattenherz wurde isoliert wie beschrieben (Kap. 2.3., 2.4.). 25 ug mRNS (in 20 mM Hepes, pH 7.0, 0.5% SDS) wurde auf 5-40% Sucrose-Gradienten (5-40% Sucrose in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS) gelagert, zentrifugiert und analysiert wie beschrieben (Kap. 2.6.). Die Kalibrierung der gemessenen Absorptionswerte (OD(260nm)) ist in willkürlichen Einheiten angegeben (ca. das 10-fache der tatsächlichen Absorptionswerte).

sequenzen der 18S rRNS und verschiedener, spezifischer mRNS (Efstratiadis 1977). Nach Passage der myokardialen mRNS über eine zweite Oligo(dT)-Cellulose-Säule (Abb. 2) und erneuter Analyse der dadurch erhaltenen, gereinigten mRNS auf Sucrose-Gradienten ist dieser Peak nicht mehr nachweisbar. Routinemäßig wurde auf eine völlige Entfernung der geringen rRNS-Kontaminierung verzichtet, da hierdurch die zellfreie Aktivität der mRNS-Präparationen nicht beeinflußt wurde (vgl. Kabat 1975).

3.1.5. In-vitro Translation myokardialer Polyribosomen

Zur Beurteilung der funktionellen Integrität von Polyribosomen-Präparationen hat sich deren zellfreie Translation in in-vitro Systemen bewährt (Baliga et al. 1968, 1976, Blobel and Potter 1976, Gamulin et al. 1972, 1978, Wall et al. 1977, Zähringer et al. 1977 a, b).

Polyribosomen werden im allgemeinen in Gegenwart der sogenannten pH 5 Enzyme und eines Energie-regenerierenden Systems translatiert (Baliga et al. 1968, Munro et al. 1975). Die Zugabe myokardialer Polyribosomen (25 ug) zu einem Reaktionsassay von 25 ul (Endkonzentration 1 mg/ml) in Gegenwart von 5 ul pH 5 Enzymen (für methodische Details vgl. Kap. 2.5., 2.8.) bewirkte die Inkorporation von ca. 30 000 Zpm (^{3}H)-Leucin (SA 30-50 Ci/mmol) in Protein in einem 5 ul Aliquot des Assays (Abb. 7). Dabei war es für die erreichbare Aminosäureninkorporation unerheblich, ob die pH 5 Enzyme aus Rattenleber oder Rattenherz stammten. Die Inkorporation von Radioaktivität war bei 37^{o}C linear für 60 Minuten und erreichte ein Plateau nach 90 Minuten.

Der Nachweis eines nahezu identischen Inkorporationsverlaufs unter Benutzung von Rattenleberpolyribosomen (Abb. 7)demonstriert die funktionelle Integrität der Polyribosomen-Präparationen.

Bei der in-vitro Translation von Polyribosomen in Gegenwart der pH 5 Enzyme und eines Energie-regenerierenden Systems erfolgt fast ausschließlich eine Elongierung der an den Polyribosomen bereits vorhandenen, naszierenden Polypeptidketten, jedoch keine Neu-

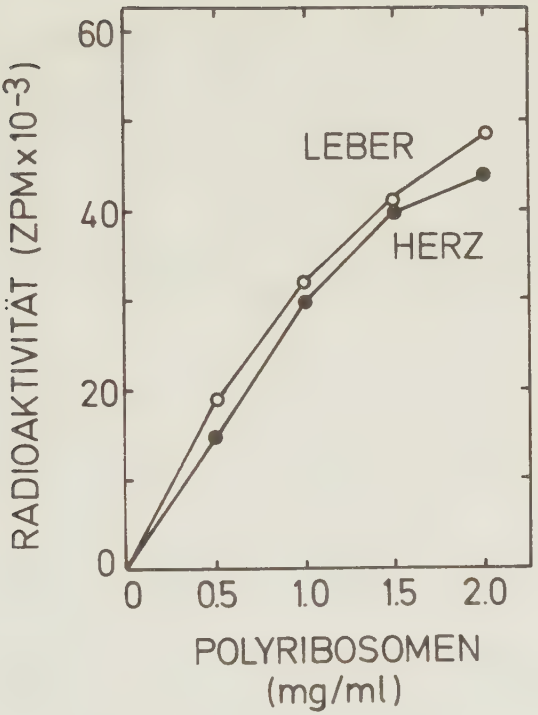


Abb. 7: In-vitro Translation von Polyribosomen aus Rattenherz (●——●) und Rattenleber (○——○).

Polyribosomen aus Rattenherz und Rattenleber wurden isoliert wie beschrieben (Kap. 2.3., 2.4.) und in Gegenwart von pH 5 Enzymen und einem Energie-regenerierenden System translatiert (Kap. 2.8.). Die angegebene Inkorporation von Radioaktivität (^{3}H-Leucin) in neusynthetisiertes Protein wurde in 5 ul Aliquots aus einem 25 ul Reaktionsassay bestimmt (Kap. 2.8.). Die angegebenen Polyribosomenkonzentrationen sind Endkonzentrationen im Assay.

Initiation von Proteinketten. Im Durchschnitt werden an jede naszierende Polypeptidkett nur einige wenige Aminosäuren neu angekoppelt (Zähringer 1981 c).

Im Rahmen der Identifizierung der zellfrei synthetisierten myokardialen Proteine wurden sodann Polyribosomen auch im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Pelham and Jackson 1976) translatiert. Diese Ergebnisse werden gemeinsam mit der Identifizierung der mRNS-Induzierten zellfreien Synthese myokardialer Proteine in Kap. 3.1.7. dargestellt. An dieser Stelle sei vorweg berichtet, daß die Polyribosomen generell eine exzellente Matrize für die zellfreie Synthese myokardialer Proteine im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System darstellen und effizient in die wichtigsten, myokardialen Proteine (Myosin, Aktin, Tropomyosin, Troponin, Myoglobin) translatiert werden können, und außerdem noch für die Synthese einer Anzahl weiterer, myokardialer Proteine kodieren, deren Identität bislang noch nicht eindeutig geklärt werden konnte.

3.1.6. In-vitro Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem und im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System

Im Rahmen der Aktivitätsprüfung von mRNS-Präparationen wird gewöhnlich deren Protein-synthetisierende Aktivität in zellfreien Systemen bestimmt. Als Parameter dient sodann der Nachweis zellfrei synthetisierter, kompletter Proteine, für die die jeweiligen mRNS-Präparationen kodieren. Obwohl eine Anzahl verschiedener biologischer Systeme für die in-vitro Translation von mRNS entwickelt wurde, haben nur wenige wirkliche Bedeutung erlangt.

Supplementiertes Retikulozyten-Lysat hat sich in der molekularbiologischen Routine als sehr effizientes, zellfreies System für die Translation exogener, heterologer mRNS bewährt. Vorschriften zur Herstellung und Benutzung dieses Systems wurden ausführlich in zahlreichen Publikationen und Übersichten beschrieben (Darnbrough et al. 1973, Gilbert and Anderson 1970, 1971, Hunt and Jackson 1974, Palmiter 1973, Schimke et al. 1974, Villa-Komaroff et al. 1974). Das durch osmotischen Schock von Retikulozyten experimentell anämi-

sierter Kaninchen gewonnene Lysat wird mit verschiedenen Substanzen supplementiert und zeichnet sich durch eine sehr ergiebige Globinsynthese aus, wobei die anfängliche Syntheserate derjenigen intakter Zellen nahe kommt. Der Nachteil der hohen endogenen mRNS-Aktivität wird durch Behandlung des Lysats mit Kalzium-aktivierter Ribonuklease ("micrococcal nuclease") umgangen (Pelham and Jackson 1976), wobei die Aktivität des Systems für die Translation exogener mRNS nicht beeinflußt wird. Die zellfreie Translation im Retikulozyten-Lysat-System steht im wesentlichen unter der Kontrolle von Eisen bzw. Hämin. In Hämin-defizienten Lysaten kommt es zur Blockierung der Reinitiation mit konsekutiver Disaggregation der Polyribosomen (Rabinovitz et al. 1969, 1974, Adamson et al. 1969, Hunt et al. 1972, London et al. 1974).

Als weiteres, häufig verwandtes zellfreies Translationssystem hat das von Marcus et al. (1970, 1974) entwickelte Weizenkeimsystem Bedeutung erlangt, das im allgemeinen in der von Roberts and Paterson (1973) beschriebenen Modifikation verwandt wird. Vorteile dieses Systems liegen in seiner einfachen Herstellung und in der relativ niedrigen endogenen mRNS-Aktivität. Frühe Untersuchungen von Marcus and Feeley (1964) hatten bereits gezeigt, daß der trockene Weizenkeim vor der ersten Berührung mit Wasser zwar funktionsfähige Ribosomen besitzt, diese aber frei von endogener mRNS sind. Ein Nachteil ist, daß verschiedene Präparationen des Weizenkeimsystems unterschiedliche, Protein-synthetisierende Aktivitäten aufweisen können (Taylor 1979, Zähringer et al. 1981 a) und deshalb jede Präparation neu standardisiert werden muß. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß verschiedene mRNS-Spezies in diesem System unterschiedliche Peptidinitiationsraten aufweisen können, wodurch eine kompetitive mRNS-Translation stattfindet (Herson et al. 1979, Lodish 1976). Die optimalen Bedingungen zur Translation von verschiedenen mRNS können stark variieren, vor allem im Hinblick auf die Konzentration von Kalium- und Magnesiumionen (Beneviste 1976, Tse et al. 1977). Suboptimale Ionenkonzentrationen können die Bildung inkompletter Peptidketten in Form von Peptidyl-tRNS aufgrund vorzeitiger Termination bedingen (Tse et al. 1977), wobei insbesondere langkettige mRNS-Moleküle betroffen sind. Daher kann sich bei

Verwendung des Weizenkeimsystems eine verläßliche Quantifizierung individueller mRNS-Mengen durch Nachweis der durch sie induzierten Synthese des entsprechenden, spezifischen Proteins problematisch gestalten (Taylor 1979). Dagegen kann die gesamte, Protein-synthetisierende Aktivität einer gegebenen mRNS-Präparation sehr einfach und zuverlässig gemessen werden. Hierzu wurde eine Modifikation (Zähringer et al. 1981 a) der von Mans and Novelli (1961) beschriebenen Methode verwendet (vgl. Kap. 2.8.). Zur Quantifizierung individueller mRNS-Moleküle in einer gegebenen Präparation von myokardialer mRNS wurde dagegen dem mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Pelham and Jackson 1976) der Vorzug gegeben.

Bei speziellen Fragestellungen kommen neben diesen beiden wichtigsten, zellfreien Systemen auch noch das Krebs-II-Maus-Aszites-System (Mathews and Korner 1970), sowie das Xenopus-laevis-Oozyten-System (Gurdon et al. 1971, Laskey et al. 1977) zur Anwendung. Die Vorteile des letzteren in-vitro Systems liegen darin, daß die Proteinsynthese mit sehr geringen Mengen an zugesetzter mRNS in Gang gebracht werden kann und über mehrere Tage mit hohem Wirkungsgrad anhält.

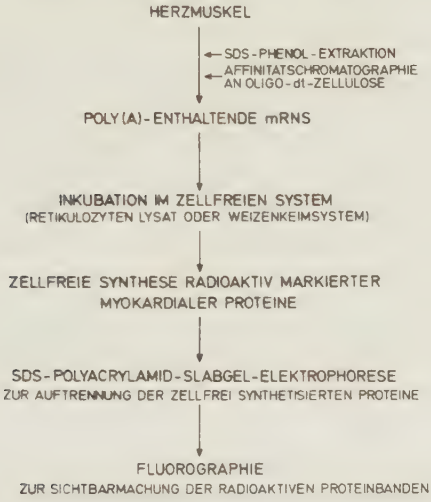
Im Rahmen der Aktivitätsprüfung myokardialer mRNS-Präparationen wurden die beiden erstgenannten zellfreien Systeme gewählt,

a) das mRNS-abhängige Retikulozyten-Lysat-System (Pelham and Jackson 1976), und

b) das Weizenkeimsystem (Roberts and Paterson 1973). Bei der Herstellung dieses Systems wurde als einzige Modifikation auf eine Prainkubation des Weizenkeim-S_{30} vor Passage durch Sephadex-G25 verzichtet.

Schema 1 zeigt diagrammatisch die Durchführung eines Experiments zur zellfreien Synthese myokardialer Proteine. Da die Translation verschiedener mRNS-Spezies im Weizenkeimsystem unterschiedliche Bedingungen für eine optimale Aminosäureninkorporation erfordern kann (s.o.), wurden die üblicherweise verwandten Inkubationsbedingungen (Roberts and Paterson 1973, Zähringer et al. 1976 b, 1977 b) für die optimale Translation myokardialer mRNS in diesem System neu standardisiert (Abb. 8). Ausgetestet wurden verschiedene Konzentrationen von Magnesium-Azetat, Kalium-Azetat, ATP, Kreatinphosphokinase,

SCHEMA1 DIAGRAMMATISCHE DARSTELLUNG EINES EXPERIMENTS ZUR ZELLFREIEN SYNTHESE MYOKARDIALER PROTEINE UNTER DER DIREKTION MYOKARDIALER mRNS



Spermin, Spermidin, Weizenkeim-S_{30}, weiterhin der Einfluß des pH des Hepes-Puffers, Inkubationszeit und Inkubationstemperatur (Abb. 8 a-k). Ferner wurde der Einfluß weiterer Faktoren überprüft. (verschiedene Konzentrationen an GTP, Aminosäuren, Zugabe von Rattenleber-tRNS und zusätzlichen Weizenkeim-S_{30}-Ribosomen), wobei sich jedoch keine weitere Zunahme der Aminosaureninkorporation erreichen ließ (GTP, Aminosäuren), z.Tl. sogar Abnahmen der Aminosäureninkorporation auftraten (Zugabe von tRNS und Weizenkeim-S_{30}-Ribosomen).

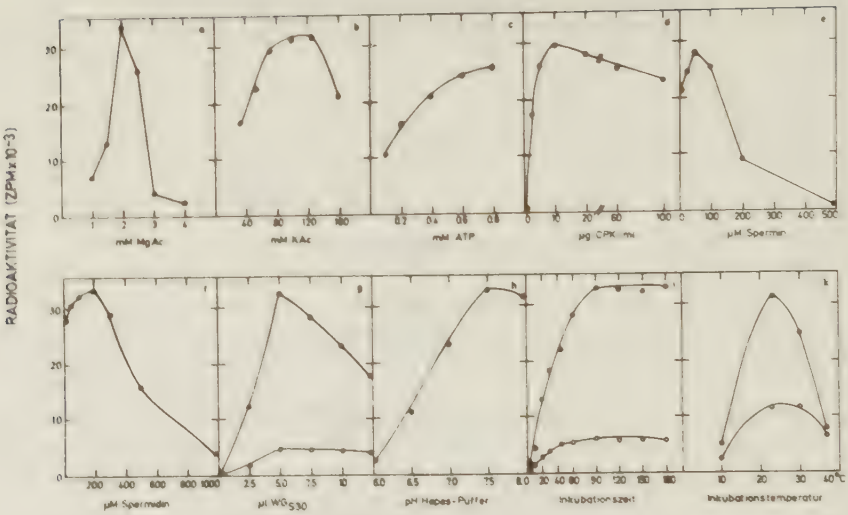


Abb. 8: Austestung optimaler Bedingungen zur in-vitro Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem

Myokardiale mRNS wurde isoliert wie beschrieben (Kap. 2.3.). Die in-vitro Translationsassays im Weizenkeimsystem wurden dergestalt durchgeführt, daß jeweils nur eine Variable verändert wurde und alle anderen Bedingungen optimal gehalten wurden. Die gemessenen Radioaktivitätswerte (Inkorporation von ^{3}H-Leucin, SA 30-50 Ci/mmol, in neusynthetisiertes Gesamt-Protein) beziehen sich auf 5 ul Aliquots der 25 ul Assays (Kap. 2.8.). Die offenen Kreise in g, i und k beziehen sich auf Reaktionsassays ohne mRNS. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß die in-vitro Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem abhängig ist von optimierten Bedingungen für Magnesium-Azetat (a), Kalium-Azetat (b), ATP (c), Kreatinphosphokinase (d), Spermin (e), Spermidin (f), Weizenkeim-S_{30} (g), pH des Hepes-Puffer (h), Inkubationszeit (i) und Temperatur (k). Jeder Assay enthielt routinemäßig 25 uM nicht-radioaktiver Aminosäuren (minus Leucin), obwohl andere Konzentrationen (0-100 uM) die Inkorporationsrate nicht wesentlich beeinflußten. Außerdem enthielt jeder Assay 3.2 uM ^{3}H-Leucin, SA 30-50 Ci/mmol, sowie mRNS-Konzentrationen von 0.5-1.5 ug mRNS/25 ul.

Die in Abb. 8 gezeigten Optima für die Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem variierten leicht mit jeder neuen Weizenkeimpräparation, so daß bei jeder neuen Präparation eine erneute Standardisierung erforderlich ist.

Unter Benutzung der dargestellten, optimalen Bedingungen für die Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem (Abb. 8) induziert 1 ug myokardialer mRNS in einem 25 ul Inkubationsansatz dieses Systems die Inkorporation von 45 000 ZpM (^{3}H)-Leucin in Gesamtprotein in einem 5 ul Assay-Aliquot (Abb. 9). Die Translation von Leber-mRNS (Abb. 9) ergab ähnliche Verhältnisse.

Dieses Ergebnis läßt eine erhaltene, funktionelle Integrität der isolierten, myokardialen mRNS vermuten. Diese Schlußfolgerung wird gestützt durch Analyse und Identifizierung der mRNS-induzierten, zellfrei synthetisierten, myokardialen Proteine (Kap. 3.1.7.).

Zusätzlich zu ihrer Translation im Weizenkeimsystem, wurde die myokardiale mRNS auch im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Pelham and Jackson 1976) translatiert. Die optimalen Bedingungen zur Translation myokardialer mRNS waren in den durchgeführten Untersuchungen praktisch identisch mit den von Pelham and Jackson (1976) beschriebenen Bedingungen für die Translation von Hämoglobin-mRNS. 1.6 ug myokardialer mRNS induzierte in einem 25 ul Inkubationsansatz die Inkorporation von 58 700 ZpM (^{35}S)-Methionin in Gesamt-Protein in einem 1 ul Assay-Aliquot (Minus-mRNS-Kontrolle 14 847 ZpM).

Im Vergleich der beiden Systeme erwiesen sich beide ähnlich effizient in der zellfreien Translation myokardialer mRNS, wobei das Weizenkeimsystem jedoch eine deutlich höhere, vorzeitige Terminationsrate aufwies als das Retikulozyten-Lysat-System (30-50% Freisetzung naszierender, unfertiger Proteinketten gegenüber 15-25%), ein Problem, das auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Taylor 1979).

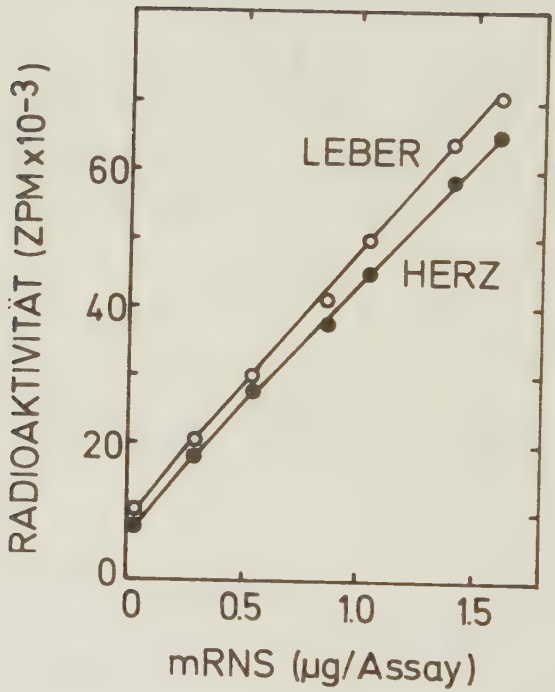


Abb. 9: In-vitro Translation von mRNS aus Rattenherz (●——●) und Rattenleber (o——o) im Weizenkeimsystem

Die jeweils angegebenen Mengen von mRNS aus Herz und Leber wurden in 25 ul Assays in Gegenwart von Weizenkeim-S_{30} zellfrei in Protein translatiert wie beschrieben (vgl. Kap. 2.8.) Es wurden die in Abb. 8 dargestellten, optimalen Bedingungen für die in-vitro Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem eingehalten. Die Messung der Radioaktivitätsinkorporation in neusynthetisiertes Gesamt-Protein erfolgte in 5 ul Aliquots wie beschrieben (Kap. 2.8.).

3.1.7. Identifizierung der in-vitro synthetisierten, myokardialen Proteine

Zur Identifizierung der zellfrei synthetisierten, myokardialen Proteine wurde eine Kombination von SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Elektrophorese (Maizel 1971) und anschließender Fluorographie des gefärbten und wieder entfärbten Gels (Bonner and Laskey 1974) verwendet. Im Falle von Aktin wurde zusätzlich noch eine chemische Isolierung von neusynthetisiertem Aktin aus zellfreien Inkubationsansätzen myokardialer mRNS durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.).

Abb. 10 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, in dem myokardiale mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System und im Weizenkeimsystem translatiert wurde, und in dem die neusynthetisierten radioaktiven Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht wurden.

Durch Vergleich mit den in Lauf 1 der Abb. 10 sichtbaren, radioaktiven Standardproteinen (Myosin mit MHK und MLK 1 und 2, Phosphorylase b, Albumin, Ovalbumin, Carbonic Anhydrase, Lysozym) sowie zusätzlich verwandten, auf der Fluorographie nicht sichtbaren, nicht-radioaktiven Standardproteinen (Myosin mit MHK und MLK 1 und 2, Aktin, Troponin mit Troponin-T, -I und -C, Tropomyosin, Myoglobin, Ferritin, Cytochrom c, Adenovirus-Proteine), die entweder käuflich erhalten wurden (Myoglobin, Cytochrom c, Adenovirus-Proteine) oder aus Herzmuskel (Myosin, Aktin, Troponin, Tropomyosin) oder Leber (Albumin, Ferritin) isoliert worden waren, wurde Molekulargewicht und Identität der neusynthetisierten Proteine bestimmt.

Dadurch konnte gezeigt werden (Abb. 10), daß sowohl im Weizenkeimsystem (Lauf 5) wie auch im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Lauf 3) die wichtigsten, myokardialen Proteine zellfrei effizient synthetisiert werden können: Aktin (MG 42 000), Tropomyosin (MG 36 000), Troponin-T (MG 40 000), MLK 1 und MLK 2 (MG 25 000 und 20 000), sowie Myoglobin (MG 16 000). Deutlich kommt zum Ausdruck, daß das mRNS-abhängige Retikulozyten-Lysat-System bei der Synthese längerkettiger Proteine wesentlich effizienter arbeitet als das Weizenkeimsystem (Abb. 10, Lauf 3 bzw. Lauf 5). Dies ist

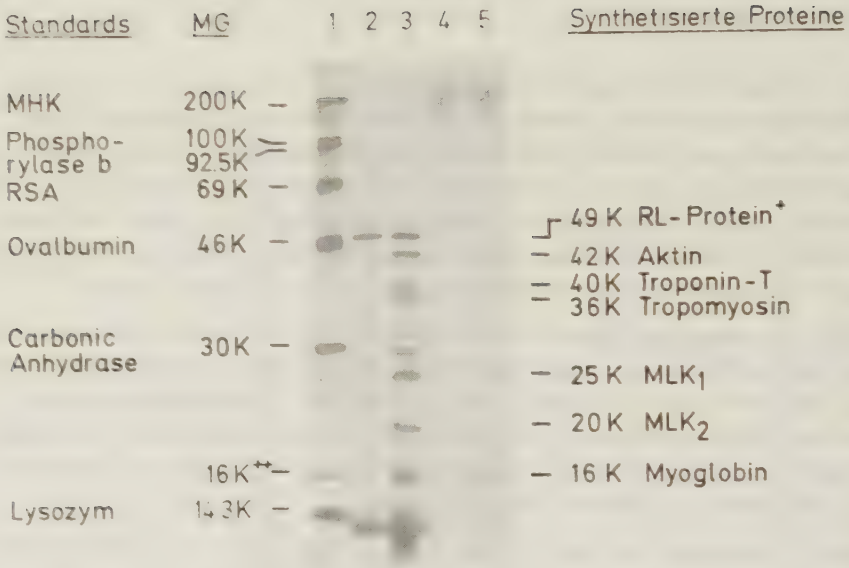


Abb. 10: Zellfreie Synthese myokardialer Proteine im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Lauf 3) und im Weizenkeimsystem (Lauf 5)

Myokardiale mRNS wurde isoliert und im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System und im Weizenkeimsystem translatiert wie beschrieben (Kap. 2.3., 2.8.) (vgl. auch Abb. 9). Die zellfrei synthetisierten Proteine (1 ul Aliquot aus einem 25 ul Reaktionsansatz) wurden auf einem 12.5% SDS-Polyacrylamid-Slabgel aufgetrennt (180 Volt für 4 1/2 Std.), das Gel anschließend fluorographiert (72 Std. Exponierung bei -80°C). Lauf 1 = radioaktive Standardproteine (14 900 ZpM), Lauf 2 und 3 = Inkubation im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System, Lauf 2: minus-mRNS-Kontrolle (11 354 ZpM), Lauf 3: 1.6 ug myokardiale mRNS (29 627 ZpM), Lauf 4 und 5 = Inkubation im Weizenkeimsystem, Lauf 4: minus-mRNS-Kontrolle (1 950 ZpM), Lauf 5: 1.3 ug myokardiale mRNS (6 100 ZpM). RL-Protein$^+$ = Protein, das auch in Abwesenheit exogener mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System synthetisiert wird. 16 K^{++} = Abbauprodukt der Carbonic Anhydrase (Lauf 1). Die dunklen Banden am Boden von Lauf 2 und 3 (MG ca. 13-14 000) sind wahrscheinlich Peptidyl-tRNS.

durch die Tendenz des Weizenkeimsystems zu einer vorzeitigen Proteinkettentermination bedingt (vgl. kap. 3.1.6.).

Die Neusynthese der Myosin-H-Kette in diesen Systemen war stets unbefriedigend. In der Position der zu erwartenden MHK zeigte sich keine eindeutige Radioaktivitätsbande. Dies entspricht Beobachtungen am Skelettmuskel, wo gezeigt wurde, daß eine effiziente Translation der Myosin-mRNS im Weizenkeimsystem oder im Retikulozyten-Lysat-System die Gegenwart partiell gereinigter "eIF 3"-Fraktion aus Skelettmuskel benötigt (Heywood 1970, Heywood et al. 1974, Heywood and Kennedy 1976, Kennedy and Heywood 1976). Voorma et al. (1977, 1979) zeigten, daß die verwendeten "eIF 3"-Fraktionen aus einem Komplex verschiedener, individueller Initiationsfaktoren bestehen, der zumindest eIF 2, eIF 3, eIF 4C, eIF 4D und eIF 5 enthält. Die beschriebene mRNS-spezifische Initiation beruht eventuell auf quantitativen Unterschieden in der relativen Zusammensetzung von Initiationsfaktoren in differenten Geweben (Revel and Groner 1978), da bislang anhand von Vergleichen mit hoch gereinigten Initiationsfaktoren aus Leber, Retikulozyten oder anderen Geweben kein Anhalt für eine Gewebespezifität von Initiationsfaktoren gefunden wurde (Benne and Hershey 1976, Picciano et al. 1973, Safer et al. 1976, Strycharz et al. 1973, Thomas et al. 1981, Thompson et al. 1977).

Später zeigte die Arbeitsgruppe von Heywood (Gette and Heywood 1979, Heywood and Kennedy 1979), daß hoch gereinigter eIF 3 aus pelletierten Polyribosomen, Ribosomen und Ribosomenuntereinheiten spezifische Komponenten enthält, die für die Stimulierung der Translation von MHK-mRNS unter kompetitiven Bedingungen verantwortlich sind. Kürzlich wurde sodann die spezifische Initiation der MHK-mRNS aus embryonalem Hühnchen-Skelettmuskel einer Proteinfraktion des MHK-mRNP-Partikels zugeschrieben (Bester et al. 1980).

Als weitere Ursache für eine mangelhafte zellfreie Synthese der MHK käme auch ein präferentieller Verlust oder eine Degradation der MHK-mRNS während ihrer Isolierung in Frage, da gerade lange mRNS-Moleküle besonders zur Degradation neigen. Eine andere Ursache könnte ferner in der Neigung langer mRNS-Moleküle zur Aggregatbildung liegen, die durch die Phenolextraktion induziert wird (Taylor 1979).

Um einen Beitrag zur Klärung dieser Möglichkeiten zu liefern, wurden myokardiale Polyribosomen im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System translatiert. Hierdurch werden zum einen die mit der mRNS-Isolierung verbundenen Gefahren (Degradation durch die Phenol-Extraktion) umgangen, zum anderen könnte sich die durch die Polyribosomen bedingte Zugabe bestimmter Faktoren zum zellfreien System positiv für die in-vitro Synthese der MHK auswirken.

Abb. 11 zeigt, daß Polyribosomen-Präparationen eine ausgezeichnete Matrize für die zellfreie Synthese der myokardialen Proteine im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System liefern, und daß insbesondere auch die Neusynthese der MHK induziert wird, jedenfalls weit besser als durch die myokardialen mRNS-Präparationen. Bei der Synthese der übrigen, myokardialen Proteine zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen der zellfreien Translation von Polyribosomen und mRNS. Eine Reihe weiterer Versuche erscheint jedoch notwendig, um den Stellenwert der einzelnen, diskutierten Möglichkeiten der unterschiedlichen Stimulation der in-vitro MHK-Synthese durch Polyribosomen und mRNS zu klären (Degradation der MHK-mRNS während der Isolierung, Aggregatbildung der mRNS für die MHK, durch die Polyribosomen bedingte Zugabe bestimmter Faktoren zum zellfreien System, die für eine effiziente MHK-Synthese benötigt werden).

Ungeklärt bleibt vorläufig auch die Beobachtung, daß im Falle von Troponin nur Troponin-T unter den neusynthetisierten, myokardialen Proteinen identifiziert werden konnte. Dies gilt sowohl für die zellfreie Translation myokardialer mRNS als auch Polyribosomen. Während das aus Herzmuskel isolierte Troponin auf SDS-Polyacrylamid-Slabgelen vier Banden mit Molekulargewichten von 40 000, 23 000, 21 000 und 14 000 Dalton zeigte, wanderte nur eine radioaktive Bande der in-vitro synthetisierten Proteine identisch mit einer Troponin-Untereinheit, entsprechend Troponin-T (MG 40 000). Für die weiteren Untereinheiten des aus Herzmuskel isolierten Troponins (Troponin-I (MG 23 000), Troponin-C (MG 21 000) und die vierte Bande (MG 14 000)) wurden keine entsprechenden radioaktiven Banden gefunden. Der Grund für diese Beobachtung bleibt vorläufig ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen, da im Herzmuskel alle Untereinheiten von Troponin annähernd in gleichen Mengen vorliegen (Weber and Murray 1973).

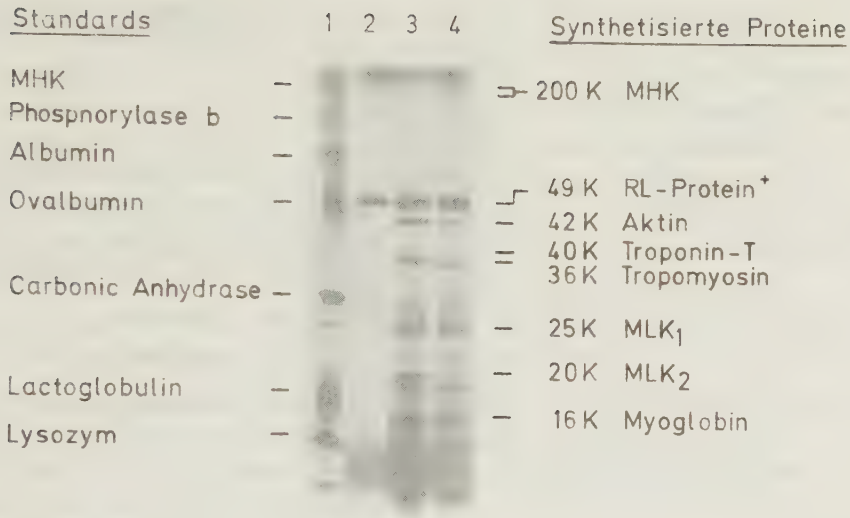


Abb. 11: Zellfreie Synthese myokardialer Proteine durch myokardiale mRNS (Lauf 3) und Polyribosomen (Lauf 4)

Myokardiale mRNS (1 ug) und Polyribosomen (30 ug) wurden im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System translatiert, die zellfrei synthetisierten Proteine durch 12.5% SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Lauf 1 = radioaktive MG-Standards, Lauf 2 = minus-mRNS-Kontrolle (26 000 ZpM), Lauf 3 = myokardiale mRNS (52 000 ZpM), Lauf 4 = myokardiale Polyribosomen (46 000 ZpM).

Grundsätzlich können jedoch sowohl die myokardialen Polyribosomen als auch die myokardiale mRNS als sehr gute Matrizen für die zellfreie Synthese der myokardialen Proteine angesehen werden (Abb. 10 und Abb. 11).

Abb. 12 zeigt ein weiteres Experiment zur zellfreien Translation myokardialer mRNS. Durch Vergleich der Translationsprodukte myokardialer mRNS von erwachsenen Ratten (Lauf 3) und Babyratten

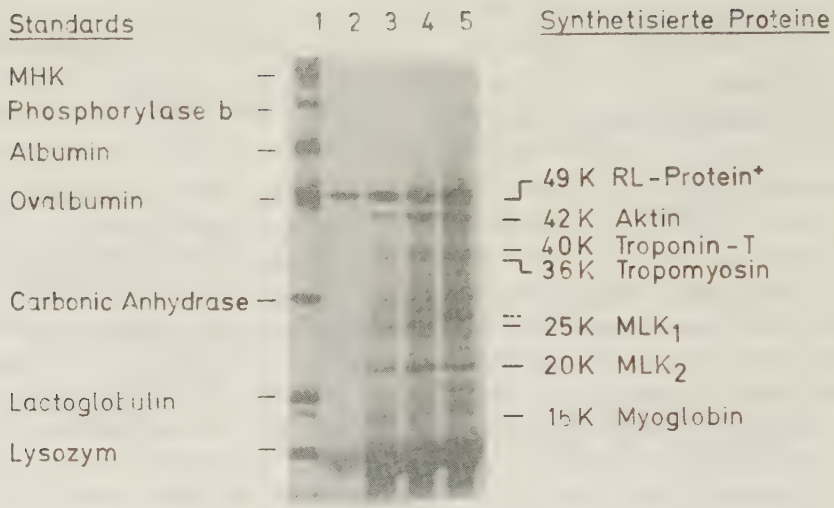


Abb. 12: Zellfreie Translation myokardialer mRNS aus 45 Tage alten Ratten (Lauf 3), neugeborenen Ratten (Lauf 4) und neugeborenen Mäusen (Lauf 5) im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System

Myokardiale mRNS wurde aus 45 Tage alten Ratten, neugeborenen Ratten und neugeborenen Mäusen isoliert, zellfrei im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System translatiert und die neusynthetisierten Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Analyse und Fluorographie identifiziert (Kap. 2.3., 2.8., 2.9.). Lauf 1 enthält verschiedene, radioaktive Standardproteine, Lauf 2 eine Retikulozyten-Lysat-Inkubation ohne Zugabe myokardialer mRNS (Kontrollinkubation).

(Lauf 4) wird demonstriert, daß während dieses Lebensabschnittes keine qualitativen Veränderungen der myokardialen Genexpression stattfinden, sondern (lediglich) solche quantitativer Natur. Junge Tiere enthalten ca. 3-4 Mal mehr myokardiale mRNS als ältere Tiere. Myokardiale mRNS aus Babymäusen (Lauf 5) kodiert dagegen für ein geringfügig anderes Proteinspektrum, wobei insbesondere die von dieser mRNS kodierte MLK 1 ein etwas höheres Molekulargewicht aufweist.

3.2. Chemische Isolierung von zellfrei synthetisiertem Aktin

Da die Übereinstimmung im Molekulargewicht zwischen einem zellfrei synthetisierten Protein und dem entsprechenden aus nativem Untersuchungsmaterial extrahierten Protein zwar ein bedeutsamer Hinweis für eine korrekte in-vitro Synthese ist, aber nicht unbedingt einen Beweis für ihre Identität darstellt, wurde am Beispiel von neusynthetisiertem Aktin eine chemische Isolierung aus zellfreien Inkubationsansätzen myokardialer mRNS durchgeführt. Die chemische Isolierung basiert auf der Eigenschaft von Aktin zur Salz-abhängigen reversiblen Polymerisation und dient

a) als weiterer Beleg für eine korrekte zellfreie Translation im Rahmen der Aktivitätsprüfung myokardialer mRNS

b) zur Quantifizierung des Gehalts myokardialer mRNS-Präparationen an spezifischer Aktin-mRNS unter der Voraussetzung, daß die Translation aller mRNS-Moleküle im zellfreien System mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft (Bag and Sarkar 1975, Lodish and Jacobson 1972, Palmiter 1973)

c) zur Quantifizierung von weiteren, myokardialen mRNS-Spezies im Zusammenhang mit der Bestimmung der Menge der von ihnen zellfrei synthetisierten Proteine.

Unter Benutzung der von Bag and Sarkar (1975) für embryonalen Hühnchen-Skelettmuskel beschriebenen Methode wurde der Gehalt der myokardialen mRNS-Präparationen an spezifischer Aktin-mRNS bestimmt. Diese Methode beinhaltet die chemische Isolierung von neusynthetisiertem Aktin durch eine Reihe von Salz-abhängigen Polymerisations- und Depolymerisationsschritten, wobei zellfreie Inkubationsansätze myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem bzw. im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System als Ausgangsmaterial dienten (Schema 2, vgl. Kap. 2.11.).

Das am Ende der Aufarbeitung erhaltene, angereicherte F-Aktin-Pellet war ca. 97% rein, wie durch SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Analyse gezeigt werden konnte (Abb. 13) und dient als weiterer Beleg für eine korrekte zellfreie Synthese.

Wenn die in Aktin inkorporierte Radioaktivität (39 600 ZpM) in

Schema 2: Chemische Isolierung von zellfrei synthetisiertem Aktin (vgl. Kap. 2.11., sowie Abb. 13)

Zellfreie Inkubation myokardialer mRNS im Retikulozyten-Lysat-System	
↓	
In-vitro Synthese myokardialer Proteine	768 000 ZpM
↓	
Zugabe von Carrier-G-Aktin (3 mg)	
↓	
Polymerisation zu F-Aktin	450 000 ZpM
↓	
Depolymerisation zu G-Aktin	262 000 ZpM
↓	
Polymerisation zu F-Aktin	39 600 ZpM
↓	
Analyse auf SDS-Polyacrylamid-Slabgel (>95% der Radioaktivität in der Aktinbande, vgl. Abb. 13)	

Beziehung gesetzt wird zur insgesamt in Protein inkorporierten Radioaktivität (768 000 ZpM) (vgl. Schema 2), erhält man den Prozentsatz der Aktin-Neusynthese relativ zur Gesamtprotein-Neusynthese. Dieser Wert beträgt 5.1%. Unter der Voraussetzung, daß die Translation aller mRNS-Moleküle im zellfreien System mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft (Lodish and Jacobson 1972, Palmiter 1973), läßt sich hieraus auch der prozentuale Anteil der Aktin-mRNS an der myokardialen Gesamt-mRNS berechnen (5.1% von 21.3 ug/g Herz = 1.1 ug/g Herz).

Zur Quantifizierung von weiteren, wichtigen, spezifischen mRNS-Spezies wurden quantitative Daten über die Menge der von ihnen zellfrei induzierten Synthese spezifischer, myokardialer Proteine bestimmt.

Abb. 14 zeigt eine solche Analyse, die eine kontinuierliche Messung der relativen Schwärzungsdichte der einzelnen Radioaktivitätsbanden

— Aktin

Abb. 13: Identifizierung von zellfrei synthetisiertem Aktin

Radioaktives, zellfrei synthetisiertes Aktin wurde aus einem in-vitro Translationsansatz (250 ul, mRNS-abhängiges Retikulozyten-Lysat-System mit 10 ug myokardialer mRNS) inkubiert (vgl. Kap. 2.11.), in Gegenwart von 3 mg nicht-radioaktiven Carrier-G-Aktins durch eine Reihe von Polymerisations-/Depolymerisationszyklen (Bag and Sarkar 1975) isoliert (vgl. auch Schema 2), auf einem 12.5% SDS-Polyacrylamid-Slabgel von noch kontaminierenden, anderen Proteinen (hauptsächlich Myosin-Leicht-Ketten) getrennt

und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Ein Scan dieses Gels zeigte mehr als 95% der Radioaktivität in der Aktinbande. Eine Rückrechnung auf die im ursprünglichen Translationsansatz vorhandene, in neusynthetisiertem Gesamt-Protein enthaltene Radioaktivität ergibt einen Wert von 5.1% für den Anteil neusynthetisierten Aktins an neusynthetisiertem Gesamt-Protein.

(Proteinbanden) einer Fluorographie darstellt.

Aus der Auswertung einer Reihe solcher Analysen (10 insgesamt, vgl. Abb. 14) zeigt sich, daß die myokardialen Proteine in-vitro unter der Direktion myokardialer mRNS in folgenden Verhältnissen zueinander synthetisiert werden: MHK : Aktin : Troponin-T : Tropomyosin : MLK 1 : MLK 2 : Myoglobin wie 0.75 : 1 : 0.33 : 0.85 : 0.59 : 0.69. Bei der Quantifizierung der MHK muß jedoch in Übereinstimmung mit kürzlich durchgeführten Experimenten (Zähringer 1981, persönliche Mitteilung) berücksichtigt werden, daß bei der direkten Translation myokardialer Polyribosmen im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System eine erheblich höhere (bis zu ca. 15-fache) Inkorporation von (^{35}S)-Methionin in die MHK erreicht wird, als bei der Translation von mRNS in diesem System, ohne daß sich die Inkorporationsrate der übrigen, myokardialen Proteine relativ zueinander verändert. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses errechnet sich, daß die MHK-mRNS ca. 50% der gesamten, myokardialen mRNS darstellt, Aktin-mRNS 5.1%, Troponin-T-mRNS 1.6%, Tropomyosin-mRNS 2.6%, MLK 1-mRNS 4%, MLK 2-mRNS 2.8% und Myoglobin-mRNS 3.2%.

Aus Untersuchungen am Skelettmuskel von Enten (Kagen and Linder 1969) und embryonalen Herzmuskel von Hühnern (Arnold and Siddiqui 1979) wurden ähnliche Werte über den Anteil von Myoglobin-mRNS (5.9%) und MLK-mRNS (2%) an der Muskel-Gesamt-mRNS mitgeteilt. Arnold and Siddiqui (1979) beobachteten bei ihren Untersuchungen am embryonalen Herzmuskel von Hühnern ein Überwiegen der MLK 1-mRNS über die MLK 2-mRNS im Verhältnis von 1.2 : 1, vergleichbar dem Verhältnis von 1.4 : 1 am Herzmuskel erwachsener Ratten (s.o.).

Unter Kenntnis des myokardialen Gehalts an Gesamt-mRNS (21.3 ug/g Herz, vgl. Kap. 3.1.2.) und an Aktin-mRNS (1.1 ug/g Herz, s.o.) wurden die folgenden Mengen an spezifischen, myokardialen mRNS-Spezies berechnet: MHK-mRNS ca. 12 ug/g Herz, Aktin-mRNS 1.1 ug/

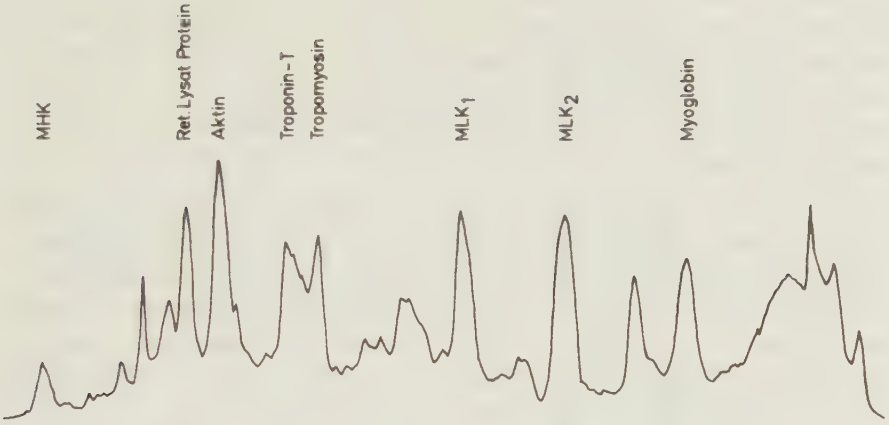


Abb. 14: Analyse der zellfreien Synthese verschiedener, myokardialer Proteine

Myokardiale mRNS wurde im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System translatiert, die zellfrei synthetisierten Proteine auf einem 12.5% SDS-Polyacrylamid-Slabgel aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht (vgl. Kap. 2.8., 2.9.). Die erhaltene Fluorographie (entsprechend den in Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12 gezeigten Fluorographien) wurde in einem DESAGA-TLC-Quick-Scan gescannt, wobei die relative Schwärzungsdichte der einzelnen Radioaktivitätsbanden durch Absorption durchfallenden Lichts gemessen wird. Ein erhaltener Scan ist in dieser Abb. dargestellt. Die Identifizierung der einzelnen Peaks erfolgte durch Vergleich mit entsprechenden, nicht-radioaktiven Standardproteinen (vgl. Kap. 2.9., 2.10.).

g Herz, Troponin-T-mRNS 0.3 ug/g Herz, Tropomyosin-mRNS 0.6 ug/g Herz, MLK 1-mRNS 0.8 ug/g Herz, MLK 2-mRNS 0.6 ug/g Herz und Myoglobin-mRNS 0.7 ug/g Herz.

3.3. Subzelluläre Verteilung der myokardialen Polyribosomen, Gesamt-RNS und mRNS

Die intrazelluläre Organisation der Proteinsynthese in eukaryonten Zellen ist ein komplexer Prozeß, wie von verschiedenen Untersuchungen bekannt ist (Munro and Steinert 1975, Shore and Tata 1977, Zähringer et al. 1977 a). Eine unterschiedliche, intrazelluläre Zellarchitektur der verschiedenen Gewebe spielt bei der Proteinsynthese eine bedeutsame Rolle (vgl. Kap. 1.1.3., 1.2.).

Die Untersuchung der intrazellulären Verteilung der myokardialen Polyribosomen, Gesamt-RNS und mRNS sollte eine Beurteilung der Frage ermöglichen, ob eine charakteristische Verteilung dieser Substanzen zwischen den verschiedenen, subzellulären Kompartments des Herzmuskels besteht, und wenn ja, in welchem Ausmaß, und ob eine solche Verteilung eine potentielle Rolle bei der Regulation der myokardialen Proteinsynthese spielt. Dabei dient

a) der Vergleich der zellfrei synthetisierten Translationsprodukte von mRNS-Präparationen aus Zellkernen, Myofibrillen, Mikrosomen und post-mikrosomalem Überstand (Zellsaft) der Klärung der funktionellen Rolle dieser intrazellulären Kompartments bei der Regulation der myokardialen Proteinsynthese, sowie der Untersuchung etwaiger Präferenzen für die Synthese einzelner, spezifischer, myokardialer Proteine
b) die zellfreie Translation von mRNS-Präparationen aus Myofibrillen insbesondere der Untersuchung der Hypothese, ob die Myofibrillen eine wesentliche Rolle bei der Synthese ihrer eigenen Proteine spielen, wie von Narayanan and Eapen (1973 a, b) und anderen Autoren (vgl. Kap. 1.2.) postuliert wurde, im Gegensatz zu Zak et al. (1967), die keinen Anhalt für einen speziellen, myofibrillären RNS-Pool fanden
c) die zellfreie Translation von mRNS-Präparationen aus dem post-mikrosomalen Überstand insbesondere der Klärung der Frage, ob im Myokard, ähnlich wie in anderen Organen (Übersicht bei Zähringer et al. 1976 a, b) ein Reserve-Pool funktionsfähiger nicht-translatierter mRNS besteht.

Abb. 15 demonstriert, daß 91.4% der myokardialen Polyribosomen aus der polyribosomalen Fraktion des myokardialen PMS gewonnen wurden.

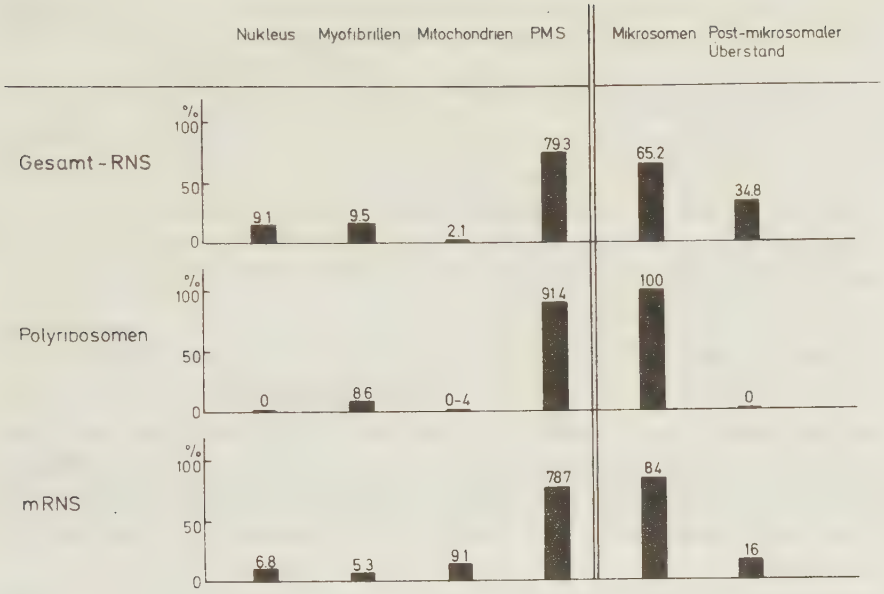


Abb. 15: Subzelluläre Verteilung von Gesamt-RNS, Polyribosomen und mRNS aus Rattenherzmuskel

Die subzellulären Kompartments des Herzmuskels (Nukleus, Myofibrillen, Mitochondrien, PMS, Mikrosomen, post-mikrosomaler Überstand) sowie die in den jeweiligen Kompartments enthaltene Gesamt-RNS, Polyribosomen und mRNS wurden isoliert wie beschrieben (Kap. 2.3., 2.12.). Die in den einzelnen Kompartments enthaltenen Mengen an Gesamt-RNS, Polyribosomen und mRNS sind als % des gesamten, myokardialen Gehalts an diesen Substanzen ausgedrückt (= Summe aus Nukleus + Myofibrillen + Mitochondrien + PMS). Der PMS setzt sich aus Mikrosomen und post-mikrosomalem Überstand zusammen. Die rechte Hälfte der Abbildung zeigt demnach die Verteilung der Gesamt-RNS, Polyribosomen und mRNS innerhalb des PMS.

Aus der nukleären, myofibrillären, mitochondrialen und post-mikrosomalen Fraktion des myokardialen Homogenats wurden dagegen jeweils keine oder nur sehr geringe Mengen an Polyribosomen isoliert (vgl. Abb. 15).

Ferner konnte gezeigt werden, daß der größte Teil der myokardialen

Gesamt-RNS (79.3%) und der mRNS (78.7%) aus dem PMS isolierbar ist (Abb. 15). Myokardiale Gesamt-RNS und mRNS verteilen sich im PMS wie folgt: 65.2% der Gesamt-RNS sind in der mikrosomalen Fraktion vorhanden (überwiegend rRNS, vgl. Abb. 4 und Abb. 5), 34.8% in der post-mikrosomalen Fraktion (überwiegend tRNS, vgl. Abb. 5). Bei der mRNS finden sich 84% in den Mikrosomen, 16% im post-mikrosomalen Überstand (Zellsaft) (Abb. 15). Im Falle der Gesamt-RNS wurden ähnliche Daten von Morgan et al. (1971) mitgeteilt, nach denen ca. 25% der zytoplasmären Gesamt-RNS im post-mikrosomalen Überstand des Herzmuskelhomogenats vorliegen.

Zellkerne, Myofibrillen und Mitochondrien enthalten nur relativ geringe Mengen an Gesamt-RNS und mRNS (Abb. 15).

Bei der zellfreien Translation der aus Zellkernen, Myofibrillen, Mikrosomen und post-mikrosomalen Überstand extrahierten mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Tabelle 3) zeigte nur die mikrosomale mRNS eine gute, in-vitro Protein-synthetisierende Aktivität.

Abb. 16 zeigt, daß im Vergleich zur mikrosomalen mRNS die mRNS-Präparationen aus Zellkernen, Myofibrillen und post-mikrosomalem Überstand keine besonderen Präferenzen für die Synthese einzelner, spezifischer, myokardialer Proteine aufweisen. Alle vier mRNS-Präparationen kodieren für praktisch die gleichen, myokardialen Proteine, obwohl große Unterschiede bestehen hinsichtlich der Menge an mRNS in diesen Fraktionen (Abb. 15) und hinsichtlich ihrer gesamten zellfreien Protein-synthetisierenden Aktivität. Diese Beobachtung bedeutet, daß alle vier mRNS-Präparationen die gleiche Zusammensetzung aus einzelnen mRNS-Spezies haben müssen.

Im Falle der nukleären und myofibrillären mRNS kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der mRNS, die aus den nukleären und myofibrillären Kompartments des Herzmuskels isoliert wurde, tatsächlich aus ko-sedimentierenden Mikrosomen stammt, die bei der Isolierung diese Fraktionen verunreinigen.

Post-mikrosomale mRNS zeigt im Vergleich zu mikrosomaler mRNS auf Sucrose-Gradienten ein niederes Molekulargewicht (Abb. 17). Wahr-

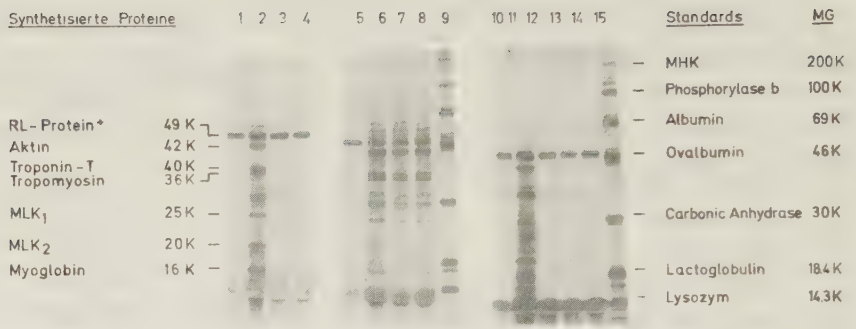
Tabelle 4: In-vitro Translation von mRNS aus der nukleären, myofibrillären, mikrosomalen und post-mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels

Herkunft der mRNS	Zellfreie, Protein-synthetisierende Aktivität (ZpM)
keine mRNS	2 800
Mikrosomen	55 000
Zellkern	34 000
Myofibrillen	31 000
post-mikrosomaler Oberstand	37 000

Myokardiale mRNS wurde aus den verschiedenen, subzellulären Kompartments des Herzmuskels isoliert und zur Bestimmung der Protein-synthetisierenden Aktivität im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System zellfrei translatiert wie beschrieben (Kap. 2.3., 2.8., 2.12.).

scheinlich handelt es sich hierbei um teilweise degradierte mRNS, die möglicherweise das Endprodukt der mikrosomalen mRNS darstellt. Diese Hypothese wird gestützt durch die relativ niedrige Protein-synthetisierende Aktivität post-mikrosomaler mRNS (Tabelle 4). Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Anwesenheit von Inhibitoren (tcRNS) für den zuletzt genannten Aspekt eine Rolle spielt, wie am embryonalen Skelettmuskel von Bester et al. (1975) beschrieben. Ein Teil dieser post-mikrosomalen mRNS ist jedoch intakt und induziert die Synthese der wichtigsten, myokardialen Proteine (Abb. 16) und könnte somit einen zytoplasmären "Reserve-Pool" myokardialer mRNS darstellen, der bei einem erhöhten Protein-synthesebedarf der Myokardzelle für die Stimulation der Protein-synthese zur Verfügung stünde, vergleichbar der Situation in anderen Organen (Civelli et al. 1980, Zähringer 1976 b).

Da die mikrosomale Fraktion des Herzmuskels den bei weitem größten Anteil an Polyribosomen (91.4%) und mRNS (78.7%) aufweist (Abb. 15), und die mikrosomale mRNS sowie die Polyribosomen für alle wesentlichen, myofibrillären Proteine kodieren, kann aus den vorliegenden



Lauf 1+5+10 = keine mRNS, Lauf 2+6+11 = mikrosomale mRNS, Lauf 3+7 = nukleäre mRNS,
Lauf 4+8 = myofibrillare mRNS, Lauf 12-14 = post-mikrosomale mRNS; Lauf 9+15 = radioaktive Standards

Abb. 16: Zellfreie Translation myokardialer mRNS aus verschiedenen, subzellulären Kompartments des Herzmuskels

Myokardiale mRNS wurde aus den nukleären, myofibrillären, mikrosomalen und post-mikrosomalen Kompartments des Herzmuskels isoliert und im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System zellfrei translatiert wie beschrieben (Kap. 2.3., 2.8., 2.12.). Die zellfrei synthetisierten Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Elektrophorese aufgetrennt und fluorographiert (Kap. 2.9.). Die Abb. zeigt eine Zusammenstellung dreier, verschiedener Gele, wobei am Fuß der Gele die in den einzelnen Läufen jeweils enthaltene mRNS-Probe angegeben ist. In Lauf 2-4 sowie Lauf 11-14 sind jeweils gleiche Mengen der einzelnen mRNS-Proben zellfrei translatiert worden (jeweils 1 ug). Da in den Reaktionsansätzen, die Lauf 3 und 4 zugrundeliegen, die aus Nuklei und Myofibrillen isolierte mRNS die Synthese nur geringer Mengen der verschiedenen, myokardialen Proteine induzierte, wurde in den Ansätzen für Lauf 6-8 zur Sichtbarmachung der Proteine, die von nukleärer und myofibrillärer mRNS kodiert werden, wesentlich mehr (ca. 2-3x) nukleäre und myofibrilläre mRNS als mikrosomale mRNS eingesetzt. Dabei wird deutlich erkennbar, daß von der nukleären und myofibrillären mRNS das grundsätzlich gleiche Muster myokardialer Proteine synthetisiert wird wie durch die mikrosomale mRNS.

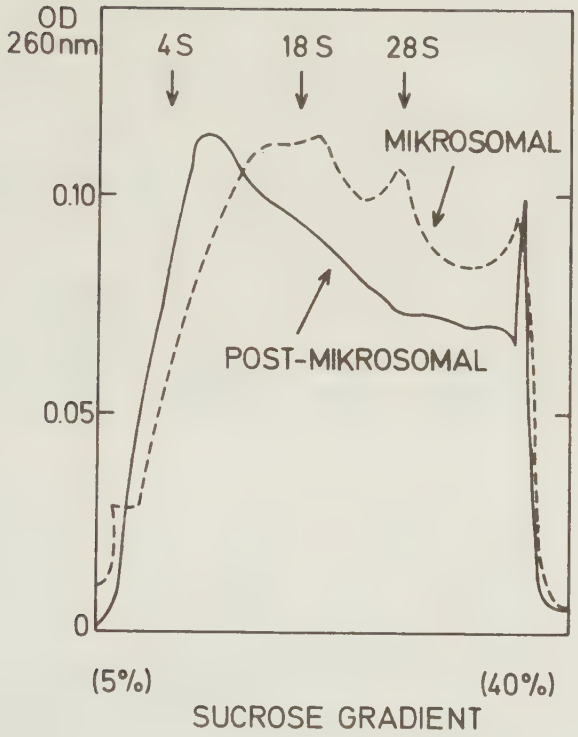


Abb. 17: Sedimentationsanalyse mikrosomaler (----) und post-mikrosomaler (——) mRNS auf kontinuierlichen, 5-40% Sucrose-Gradienten

Mikrosomale und post-mikrosomale mRNS wurden aus Herzmuskel isoliert wie beschrieben (Kap. 2.3., 2.12.). Jeweils 25 ug mRNS wurden auf Sucrose-Gradienten (5-40%) aufgetragen und das Sedimentationsverhalten der mRNS bestimmt (Kap. 2.6.). Als MG-Standards wurden verwandt: tRNS (4S), rRNS (18S und 28S).

Untersuchungen geschlossen werden, daß im Herzmuskel nur die Mikrosomen und die in ihnen enthaltenen Polyribosomen und mRNS eine bedeutsame Rolle bei der Synthese der myofibrillären Proteine spielen.

Eindeutig widerlegen die vorliegenden Ergenisse die Hypothese, daß die Myofibrillen eine wesentliche Rolle bei der Synthese ihrer eigenen Proteine spielen, wie von Narayanan and Eapen (1973 a, b) und anderen Autoren (vgl. Kap. 1.2.) postuliert worden war. Eine Bestätigung finden vielmehr Ergebnisse von Zak et al. (1967), die in Untersuchungen über die intrazelluläre Verteilung der myokardialen Ribosomen und Gesamt-RNS keinen Anhalt für einen speziellen, myofibrillären RNS-Pool fanden.

Insgesamt konnte eine charakteristische, subzelluläre Verteilung der myokardialen Gesamt-RNS, mRNS und Polyribosomen im Herzmuskel demonstriert werden, der zweifellos eine Bedeutung bei der Organisation und Regulation der myokardialen Proteinsynthese zukommt.

4. DISKUSSION

Die Isolierung, Charakterisierung und zellfreie Translation von Polyribosomen und mRNS aus verschiedenen Organen hat während der letzten zwei Jahrzehnte ein Verständnis der grundlegenden Mechanismen von Genexpression und Proteinsynthese aus molekularbiologischer Sicht ermöglicht.

mRNS-Moleküle stellen zentrale Komponenten der Genexpression von eukaryonten Zellen dar und stehen derzeit im Mittelpunkt zahlreicher molekularbiologischer Untersuchungen. Neu entwickelte Techniken wie die bakterielle Klonierung Plasmid-gebundener cDNS aus spezifischen mRNS-Spezies werden dabei unser Verständnis der Expression und Kontrolle spezifischer Komponenten komplexer Genome unter verschiedenen (normalen und pathologischen) Bedingungen noch erheblich erweitern, befinden sich jedoch derzeit noch im Anfangsstadium.

Während die Isolierung intakter Polyribosomen und mRNS inzwischen nahezu routinemäßig an vielen Organen durchgeführt wird (vgl. Kap. 1.2.), zeigten Polyribosomenpräparationen aus Herzmuskel niedere und sehr unterschiedliche Ausbeuten (Hjalmarson et al. 1975, Koelbel et al. 1970, Meerson et al. 1974, Morgan et al. 1971 a, b, Zähringer 1979 b), ferner eine degradierte Struktur bei der Analyse auf Sucrose-Gradienten (Hjalmarson et al. 1975, Meerson et al. 1974, Morgan et al. 1971 a, b). Arbeiten zur Isolierung myokardialer mRNS lagen dagegen überhaupt noch nicht vor.

Dies lag nicht zuletzt an den Schwierigkeiten, die der Herzmuskel molekularbiologischen Untersuchungsmethoden entgegensetzt. Im Unterschied zu anderen Organen besitzt der Herzmuskel erwachsener Tiere - und natürlich auch des Menschen - durch die in den Myofibrillen angeordneten, kontraktilen Proteine eine sehr rigide, intrazelluläre Struktur, die es nicht erlaubte, strukturell und funktionell intakte Polyribosomen und mRNS in ausreichender Menge aus Herzmuskel zu isolieren.

Die systematische Modifikation zur Verfügung stehender Methoden zur Isolierung von Polyribosomen (Übersicht bei Zähringer et al. 1977 a) und von mRNS (Übersicht bei Brawerman 1974, Taylor 1979), sodaß sie auf das Untersuchungsmaterial des Herzmuskels erwachsener Versuchstiere anwendbar würden, wurde erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommen. Daneben berichteten Arnold and Siddiqui (1979) über die Isolierung von Myosin-Leicht-Ketten-mRNS aus embryonalen Hühnerherzen und es erscheint möglich, daß die Methode dieser Autoren auch am Herzmuskel erwachsener Versuchstiere einsetzbar sein könnte, was jedoch noch einer Überprüfung bedarf.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die Isolierung, Charakterisierung und zellfreie Translation myokardialer Polyribosomen und mRNS, sowie Untersuchungen zur Verteilung von Gesamt-RNS, Polyribosomen und mRNS in den verschiedenen, subzellulären Kompartments der Myokardzelle zur Abklärung der Frage, ob eine solche Verteilung eine potentielle Rolle bei der Regulation der myokardialen Proteinsynthese spielt.

Myokardiale Polyribosomen und mRNS können unter Verwendung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu entwickelten und erstmalig beschriebenen Isolierungsmethoden (vgl. Kap. 2.3., 3.1.1., 3.1.2.) in hoher Ausbeute aus Herzmuskel gewonnen werden (865 ug Polyribosomen/g Herz und 21.3 ug mRNS/g Herz). Dies bedeutet eine Steigerung der bisher beschriebenen Polyribosomen-Ausbeute aus Herzmuskel um 50-500%. Die mRNS-Ausbeute ist im Vergleich mit anderen Organen sehr hoch und dürfte unter Verwendung der beschriebenen Isolierungsprozedur (Kap. 2.3.) repräsentativ sein für die in der Myokardzelle tatsächlich vorhandene mRNS. Metafora et al. (1980) berichteten über eine ähnliche mRNS-Ausbeute aus Skelettmuskel (26 ug/g Skelettmuskel).

Zähringer (1981 c) zeigte anhand von Hybridisierungsexperimenten myokardialer mRNS an (^{3}H)Poly(U), daß der tatsächliche Gehalt an myokardialer mRNS 2-2.5 Mal höher liegt, als der mit der beschriebenen Methode (Kap. 2.3.) isolierbare Anteil, und mindestens 50 ug/g Herz beträgt.

In einigen Präparationen myokardialer mRNS wurde entsprechend den Vorschlägen anderer Autoren für Leber-mRNS (Sala-Trepat et al. 1978) und Gehirn-mRNS (Bantle et al. 1976 a, b) die eluierte myokardiale mRNS ein zweites Mal an Oligo(dT)-Cellulose adsorbiert (vgl. Abb. 2). Dabei zeigte sich, daß 13.4% der mRNS bei der zweiten Passage nicht retiniert werden, wobei es sich wahrscheinlich um kontaminierende rRNS handelt. Von Untersuchungen an anderen Organen ist bekannt (Kabat 1975, Taylor 1979, Wall et al. 1977), daß rRNS oft stark an mRNS gebunden ist, möglicherweise aufgrund kurzer komplementärer Nukleotidsequenzen der 18S rRNS und verschiedener, spezifischer mRNS (Efstratiadis 1977). Routinemäßig konnte auf eine völlige Entfernung der geringen rRNS-Kontaminierung verzichtet werden, da hierdurch die zellfreie Aktivität der mRNS nicht negativ beeinflußt wurde (vgl. auch Kabat 1975). Bei Auslassung des Erwärmungsschritts der mikrosomalen RNS (58°C, 3 Min., vgl. Kap. 2.3.) vor Applikation auf die Oligo(dT)-Cellulose-Säule nimmt die an mRNS gebundene rRNS-Fraktion erheblich zu. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von McKnight and Schimke (1974) für Ovalbumin-mRNS mitgeteilt.

Eine Analyse des Sedimentationsverhaltens der isolierten Polyribosomen, mikrosomalen RNS und mRNS (Abb. 3-6) belegt deren weitgehende bzw. völlige strukturelle Integrität (vgl. Kap. 3.1.3., 3.1.4.). Das beobachtete Sedimentationsverhalten entspricht demjenigen von Polyribosomen, mikrosomaler RNS und mRNS aus Leber (Baliga et al. 1968, Blobel and Potter 1967, Gamulin et al. 1972, Munro et al. 1975, Pronczuk et al. 1968, Ramsey and Steele 1976, Sala-Trepat et al. 1978, Zähringer et al. 1977 a) und aus anderen Organen (Baliga et al. 1976, Groner et al. 1977, Irwin et al. 1975, Mechler and Vassalli 1975, Mondal et al. 1974, Ouellette et al. 1976, Przybyla and Strohman 1974, Wall et al. 1977).

Im Vergleich zu publizierten Sucrose-Gradienten verschiedener, anderer Präparationen myokardialer Polyribosomen (Hjalmarson et al. 1975, Meerson et al. 1974, Morgan et al. 1971 a, b) zeigen unsere Polyribosomenpräparationen einen wesentlich höheren Anteil schwerer Polyribosomen (im Gegensatz zu Monoribosomen und Ribosomenuntereinheiten) als Ausdruck einer besser erhaltenen, strukturellen Integrität (Abb. 3).

Im Rahmen der Aktivitätsprüfung von Polyribosomen- und mRNS-Präparationen wird gewöhnlich deren Protein-synthetisierende Aktivität in zellfreien Systemen bestimmt. Als Parameter dient sodann der Nachweis zellfrei synthetisierter, kompletter Proteine.

Polyribosomen werden im allgemeinen in Gegenwart von pH 5 Enzymen und einem Energie-regenerierenden System translatiert (Baliga et al. 1968, Munro et al. 1975). Im pH 5 Enzym-System erfolgt fast ausschließlich eine Elongierung der an den Polyribosomen bereits vorhandenen, naszierenden Polypeptidketten, jedoch keine Neuinitiation. Durchschnittlich werden nur einige wenige Aminosäuren neu angekoppelt (Zähringer 1981 c). Polyribosomen wurden deshalb im Rahmen der Identifizierung der durch sie induzierten, zellfrei synthetisierten, myokardialen Proteine sodann auch im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System translatiert (s.u.). Im pH 5 Enzym-System zeigten myokardiale Polyribosomen im Vergleich zu Rattenleberpolyribosomen einen nahezu identischen Aminosäuren-Inkorporationsverlauf (Abb. 7). Dieses Ergebnis läßt eine erhaltene, funktionelle

Integrität der myokardialen Polyribosomenpräparationen vermuten. Für die erreichbare Aminosäureninkorporation war es dabei unerheblich, ob die pH 5 Enzyme zur Translation myokardialer Polyribosomen aus Rattenherzen oder Rattenlebern stammten.

Im Rahmen der Aktivitätsprüfung myokardialer mRNS-Präparationen wurde deren Protein-synthetisierende Aktivität im Weizenkeimsystem (Roberts and Paterson 1973) und im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Pelham and Jackson 1976) bestimmt. Beide Systeme wurden bereits ausführlich in Kap. 3.1.6. diskutiert und erwiesen sich im Vergleich als ähnlich effizient in der zellfreien Translation myokardialer mRNS. Das Weizenkeimsystem zeigte jedoch eine deutlich höhere, vorzeitige Terminationsrate als das mRNS-abhängige Retikulozyten-Lysat-System (30-50% Freisetzung naszierender, unfertiger Proteinketten gegenüber 15-25%), ein Problem, das auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Taylor 1979). Die in Abb. 8 gezeigten Optima für die Translation myokardialer mRNS im Weizenkeimsystem variierten leicht mit jeder neuen Weizenkeimpräparation, so daß bei jeder Präparation dieses Systems eine erneute Standardisierung notwendig ist. Die effiziente zellfreie Translation myokardialer mRNS in beiden Systemen ließ bereits eine erhaltene, funktionelle Integrität der mRNS-Präparationen vermuten. Diese Schlußfolgerung wird gestützt durch Analyse und Identifizierung der mRNS-induzierten, zellfrei synthetisierten, myokardialen Proteine.

Zur Identifizierung der zellfrei synthetisierten, myokardialen Proteine wurde eine Kombination von SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Elektrophorese (Maizel 1971) und anschließender Fluorographie des gefärbten und wieder entfärbten Gels (Bonner and Laskey 1974) verwendet. Im Falle von Aktin wurde zusätzlich noch die chemische Isolierung von neusynthetisiertem Aktin aus zellfreien Inkubationsansätzen myokardialer mRNS durchgeführt.

Durch Vergleich mit den wichtigsten, aus Herzmuskel isolierten, myofibrillären Proteinen (vgl. Kap. 2.10.) sowie weiteren, radioaktiven und nicht-radioaktiven Standardproteinen, wurden Molekulargewicht und Identität der neusynthetisierten, myokardialen Proteine

bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl im Weizenkeimsystem wie auch im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System die wichtigsten, myokardialen Proteine synthetisiert werden: Aktin (MG 42 000), Troponin-T (MG 40 000), Tropomyosin (MG 36 000), MLK 1 (MG 25 000), MLK 2 (MG 20 000), sowie Myoglobin (MG 16 000). Deutlich kommt zum Ausdruck, daß das mRNS-abhängige Retikulozyten-Lysat-System bei der Synthese längerkettiger Proteine wesentlich effizienter arbeitet als das Weizenkeimsystem (Abb. 10). Mehrere, weitere, zellfrei synthetisierte Proteine konnten bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden.

Die mRNS-induzierte Neusynthese der MHK in den verwandten zellfreien Systemen war stets unbefriedigend, im Gegensatz zur zellfreien Translation von Polyribosomen, die im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System die Neusynthese der MHK erheblich besser induzierten. Bei der Synthese der übrigen, myokardialen Proteine zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen der zellfreien Translation von Polyribosomen und mRNS (Abb. 11).

Als mögliche Ursache für die beobachtete mangelhafte in-vitro Synthese der MHK käme ein präferentieller Verlust oder eine Degradation der MHK-mRNS während der Isolierung in Frage, da gerade lange mRNS-Moleküle zur Degradation neigen. Eine andere Ursache könnte in der Neigung langer mRNS-Moleküle zur Aggregatbildung liegen, die durch die Phenol-Extraktion induziert wird (Taylor 1979). Als weitere Möglichkeit ist eine mRNS-spezifische Initiation zu diskutieren (vgl. Kap. 3.1.7.), die auf quantitativen Unterschieden in der relativen Zusammensetzung von Initiationsfaktoren in differenten Geweben beruht (Revel and Groner 1978). Hierfür sprechen vor allem Beobachtungen am Skelettmuskel, wo gezeigt wurde, daß eine effiziente Translation von Myosin-mRNS im Weizenkeimsystem oder im Retikulozyten-Lysat-System die Gegenwart partiell gereinigter "eIF 3"-Fraktion benötigt (Heywood et al. 1974, Heywood and Kennedy 1976, Kennedy and Heywood 1976), welche aus Polyribosomen des Skelettmuskels gewonnen wurde. Bester et al. (1980) berichteten sodann über eine Stimulierung der Translation der MHK-mRNS aus Hühnchen-Skelettmuskel im Weizenkeimsystem durch eine Proteinfraktion des

MHK-mRNP-Partikels. Eine Reihe weiterer Versuch ist notwendig, um den Stellenwert der einzelnen, diskutierten Möglichkeiten der unterschiedlichen Stimulation der in-vitro MHK-Synthese der Polyribosomen und mRNS zu klären (Degradation der MHK-mRNS während der Isolierung, Aggregatbildung der MHK-mRNS, durch die Polyribosomen bedingte Zugabe bestimmter Faktoren zum zellfreien System, die für eine effiziente MHK-Synthese benötigt werden).

Ungeklärt bleibt vorläufig die Beobachtung, daß im Falle von Troponin nur Troponin-T unter den neusynthetisierten, myokardialen Proteinen identifiziert werden konnte. Dies gilt sowohl für die zellfreie Translation myokardialer mRNS als auch Polyribosomen. Im Vergleich mit aus Herzmuskel isoliertem Troponin wanderte nur eine Bande der in-vitro synthetisierten Proteine identisch mit einer Troponin-Untereinheit, entsprechend Troponin-T. Für die weiteren Troponin-Untereinheiten, nämlich Troponin-I und Troponin-C, wurden keine entsprechenden radioaktiven Banden gefunden. Diese Beobachtung bedarf weiterer Untersuchungen, da im Herzmuskel die Untereinheiten von Troponin annähernd in gleichen Mengen vorliegen (Weber and Murray 1973).

Grundsätzlich können jedoch sowohl die myokardialen Polyribosomen- als auch die myokardialen mRNS-Präparationen als sehr gute Matrizen für die zellfreie Synthese der wichtigsten, myokardialen Proteine angesehen werden (vgl. Abb. 10-12).

Da die Übereinstimmung im Molekulargewicht zwischen einem zellfrei synthetisierten Protein und dem entsprechenden aus nativem Herzmuskel extrahierten Protein zwar ein bedeutsamer Hinweis für eine korrekte in-vitro Synthese ist, aber nicht unbedingt einen Beweis für ihre Identität darstellt, wurde am Beispiel von neusynthetisiertem Aktin eine chemische Isolierung aus zellfreien Translationsansätzen myokardialer mRNS durchgeführt. Die chemische Isolierung basiert auf der funktionellen Eigenschaft von Aktin zur Salz-abhängigen reversiblen Polymerisation. Das am Ende der Isolierung erhaltene, angereicherte Aktin war ca. 97% rein, und dient als weiterer Beleg für eine korrekte zellfreie Synthese (vgl. Abb. 13).

Unter der Voraussetzung, daß die Translation aller mRNS-Moleküle im zellfreien System mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft (Lodish and Jacobson 1972, Palmiter 1973), wurde anhand des Prozentsatzes der Aktin-Neusynthese relativ zur Gesamtprotein-Neusynthese der Anteil der Aktin-mRNS an der isolierten myokardialen Gesamt-mRNS berechnet, entsprechend dem Vorgehen von Bag and Sarkar (1975) am Skelettmuskel. Dabei ergab sich ein Wert von 1.1 ug Aktin-mRNS/ g Herz.

Die Quantifizierung von weiteren, spezifischen mRNS-Spezies kann über die Bestimmung der Menge der von ihnen zellfrei synthetisierten, spezifischen, myokardialen Proteine bestimmt werden. Da die zellfreie Proteinsynthese streng mRNS-abhängig ist, entspricht das Verhältnis der einzelnen, spezifischen Proteine auch dem Verhältnis der entsprechenden mRNS-Spezies. Unter Kenntnis des myokardialen Gehalts an extrahierbarer Gesamt-mRNS (21.3 ug/g Herz) und an Aktin-mRNS (1.1 ug/g Herz) wurden die folgenden Mengen an spezifischen, myokardialen mRNS-Spezies berechnet: MHK-mRNS ca. 12 ug/ g Herz, Aktin-mRNS 1.1 ug/g Herz, Troponin-T-mRNS 0.3 ug/g Herz, Tropomyosin-mRNS 0.6 ug/g Herz, MLK 1-mRNS 0.8 ug/g Herz, MLK 2-mRNS 0.6 ug/g Herz, Myoglobin-mRNS 0.7 ug/g Herz. Bei der Quantifizierung der MHK-mRNS wurde in Übereinstimmung mit kürzlich durchgeführten Experimenten (Zähringer 1981, persönliche Mitteilung) berücksichtigt, daß bei der direkten Translation von Polyribosomen im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System eine erheblich höhere (bis zu ca. 15-fache) Inkorporation von (^{35}S)-Methionin in die MHK erreicht wird, als bei der Translation von mRNS in diesem System, ohne daß sich die Inkorporationsrate der übrigen, myokardialen Proteine relativ zueinander verändert.

Diese Ergebnisse sind ähnlich den von Arnold and Siddiqui (1979), Metafora et al. (1980) sowie von Kagen and Linder (1969) mitgeteilten Beobachtungen über die zellfreie Translation von Skelettmuskel-mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System (Metafora et al. 1980) und über den Anteil von Myoglobin-mRNS (Kagen and Linder 1969) bzw. MLK 1-mRNS und MLK 2-mRNS (Arnold and Siddiqui 1979) an der Gesamt-mRNS von Skelettmuskel bzw. embryonalen Herzmuskel.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu erarbeiteten und erstmalig beschriebenen Methoden zur Isolierung und Charakterisierung intakter myokardialer Polyribosomen und mRNS wurden sodann zu einer detaillierten Untersuchung der subzellulären Verteilung der myokardialen Polyribosomen, Gesamt-RNS und mRNS eingesetzt. Hierdurch sollte eine Beurteilung der Frage ermöglicht werden, ob eine charakteristische Verteilung dieser Substanzen zwischen den verschiedenen subzellulären Kompartments des Herzmuskels besteht, da aus verschiedenen Arbeiten bekannt war, daß in eukaryonten Zellen die intrazelluläre Organisation der Transkription und Translation eine bedeutsame Rolle bei der Regulation dieser Vorgänge spielt (vgl. Kap. 1.1., 1.2.).

Dabei konnte demonstriert werden, daß der größte Teil der myokardialen Polyribosomen, Gesamt-RNS und mRNS in der mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels vorliegt (Abb. 15). Nur geringe Mengen dieser Substanzen konnten aus den nukläreη, myofibrillären, mitochondrialen und post-mikrosomalen Kompartments des Herzmuskels isoliert werden. Ferner zeigte sich, daß lediglich die mikrosomalen Polyribosomen und die mikrosomale mRNS eine wesentliche Rolle bei der Synthese der myofibrillären Proteine spielen (vgl. Kap. 3.3.).

Bei der zellfreien Translation zeigten mRNS-Präparationen aus Zellkernen, Myofibrillen und post-mikrosomalem Überstand keine besonderen Präferenzen für die Synthese einzelner, spezifischer, myokardialer Proteine (Abb. 16). Alle vier mRNS-Präparationen kodieren für praktisch die gleichen, myokardialen Proteine, obwohl große Unterschiede bestehen hinsichtlich der Menge an mRNS in diesen Fraktionen und hinsichtlich ihrer gesamten zellfreien Protein-synthetisierenden Aktivität. Im Falle der nukleären und myofibrillären mRNS kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der jeweiligen, isolierten mRNS aus ko-sedimentierenden Mikrosomen stammt, die bei der Isolierung diese Fraktionen verunreinigen.

Diese Ergebnisse widerlegen eindeutig die Hypothese, daß die Myofibrillen eine wesentliche Rolle bei der Synthese ihrer eigenen Proteine spielen, wie von Narayanan and Eapen (1973 a, b) und anderen Autoren (vgl. Kap. 1.2.) postuliert wurde. Eine Bestätigung

finden vielmehr Ergebnisse von Zak et al. (1967), die in Untersuchungen über die intrazelluläre Verteilung der myokardialen Ribosomen und Gesamt-RNS keinen Anhalt für einen speziellen, myofibrillären RNS-Pool fanden.

Der Nachweis nicht-translatierter mRNS im post-mikrosomalen Überstand (Zellsaft) vieler Gewebe (Übersicht bei Zähringer et al. 1976 a, b) hat das Interesse an einer möglichen Rolle dieses speziellen, subzellulären Kompartments bei der Regulation der zellulären Proteinsynthese stimuliert. In verschiedenen Geweben liegen 10-80% der gesamten, zytoplasmären mRNS in nicht-translatierter Form in diesem subzellulären Kompartment vor (Übersichten bei Civelli et al. 1980, MacLeod 1975, Zähringer et al. 1976 a, b). Zur Funktion der post-mikrosomalen mRNS gibt es eine Reihe von Hypothesen, wobei ihre Funktion im zellulären Metabolismus der verschiedenen Organe noch nicht hinreichend geklärt ist:

a) Es handelt sich um mRNS, die degradiert ist oder gerade abgebaut wird,

b) um mRNS, die gerade vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert wurde und noch nicht in Polyribosomen inkorporiert ist,

c) um mRNS, die als Reserve-Pool zur Stimulierung der Proteinsynthese unter bestimmten Bedingungen dient,

d) um spezifische mRNS-Moleküle, die speziellen, translationären Kontroll- und Regulationsmechanismen unterliegen (z.B. Ferritin-mRNS, vgl. Zähringer 1979 a).

Schließlich könnte es sich auch um eine heterogene Gruppe von mRNS handeln, die sich aus verschiedenen mRNS-Subpopulationen zusammensetzt und mehrere (oder alle) der unter a) - d) genannten Möglichkeiten beinhaltet.

Die demonstrierten Ergebnisse zur subzellulären Fraktionierung am Herzmuskel belegen (vgl. Kap. 3.3.), daß ein Pool nicht-translatierter mRNS im Zellsaft existiert, der ca. 16% der gesamten zytoplasmären mRNS ausmacht (Abb. 15). Ein Teil dieser post-mikrosomalen mRNS ist zweifellos intakt und induziert die Synthese der wichtigsten, myokardialen Proteine (Abb. 16). Es könnte sich somit um

einen zytoplasmären Reserve-Pool myokardialer mRNS handeln, der bei einem erhöhten Proteinsynthesebedarf der Myokardzelle für die Stimulation der Proteinsynthese zur Verfügung stünde, vergleichbar der Situation in anderen Organen (Civelli et al. 1980, Zähringer et al. 1976 b). Zum anderen könnte dieser spezielle mRNS-Pool auch Endprodukte (oder Zwischenprodukte) des mRNS-Abbaus enthalten, da ein Teil der post-mikrosomalen mRNS sehr wahrscheinlich degradierte mRNS ist. Letztere Annahme stützt sich auf die relativ niedrige, Protein-synthetisierende Aktivität (Inkorporation in Gesamtprotein) der post-mikrosomalen mRNS (Tabelle 4), ihre relativ niedrige Kapazität zur zellfreien Synthese der wesentlichen, myokardialen Proteine (Abb. 16), sowie ihr niederes Molekulargewicht bei Analyse des Sedimentationsverhaltens auf Sucrose-Gradienten (Abb. 17).

Insgesamt zeigen die Untersuchungen zur subzellulären Fraktionierung, daß am Herzmuskel - wie auch in anderen Organen - eine charakteristische, subzelluläre Verteilung der Gesamt-RNS, mRNS und Polyribosomen besteht, die bei der Organisation der myokardialen Proteinsynthese eine bedeutende Rolle spielt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Gegensatz zu anderen Organen ist über die grundlegenden Prozesse von Transkription und Translation am Herzmuskel noch immer relativ wenig bekannt.

Eine der Hauptursachen liegt nicht zuletzt an den Schwierigkeiten, die der Herzmuskel molekularbiologischen Untersuchungsmethoden entgegensetzt. Im Unterschied zu anderen Organen besitzt nämlich der Herzmuskel durch die in den Myofibrillen angeordneten, kontraktilen Proteine eine sehr rigide, intrazelluläre Struktur, die die Isolierung strukturell und funktionell intakter Polyribosomen und mRNS in hoher Ausbeute schwierig gestaltete.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die Isolierung, Charakterisierung und zellfreie Translation myokardialer Polyribosomen und mRNS, sowie Untersuchungen zur Verteilung von Gesamt-RNS, Polyribosomen und mRNS in den verschiedenen, subzellulären Kompartments der Myokardzelle.

Erste Aufgabe mußte sein, zur Verfügung stehende Methoden der Polyribosomen- und mRNS-Isolierung, die erfolgreich an anderen Organen eingesetzt worden waren, so zu modifizieren, daß sie trotz der bestehenden Schwierigkeiten die Isolierung intakter Polyribosomen und mRNS aus Herzmuskel in hoher Ausbeute ermöglichen würden. Als weiterer Hauptpunkt stand die Aktivitätsprüfung myokardialer Polyribosomen im Vordergrund.

Diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu erarbeiteten und erstmalig beschriebenen Methoden der Isolierung und Charakterisierung strukturell und funktionell intakter, myokardialer Polyribosomen und mRNS wurden sodann zu einer detaillierten Untersuchung der subzellulären Verteilung von Gesamt-RNS, Polyribosomen und mRNS im Myokard eingesetzt. Hierdurch sollte die Frage geklärt werden, ob eine solche Verteilung eine potentielle Rolle bei der Regulation der myokardialen Proteinsynthese spielt.

Unter Verwendung der beschriebenen Methoden konnten Polyribosomen und mRNS aus Rattenherzmuskel in hoher Ausbeute isoliert werden: 865 ug Polyribosomen/g Herz, bzw. 21.3 ug mRNS/g Herz.

Durch Analyse des Sedimentationsverhaltens auf Sucrose-Gradienten und in-vitro Translation in zellfreien Systemen wurde die strukturelle und funktionelle Integrität der myokardialen Polyribosomen- und mRNS-Präparationen belegt.

In zwei mRNS-abhängigen, zellfreien Systemen, dem Weizenkeimsystem (Roberts and Paterson 1973) und dem Retikulozyten-Lysat-System (Pelham and Jackson 1976), wurde die effiziente, in-vitro Synthese der wesentlichen myofibrillären Proteine (Myosin, Aktin, Troponin-T, Tropomyosin) sowie von Myoglobin induziert und quantitativ erfaßt. Dadurch wurde eine qualitative und quantitative Bestimmung der entsprechenden, spezifischen, myokardialen mRNS möglich.

Die Untersuchungen zur zellfreien Synthese myokardialer Proteine stellen dabei überhaupt den erstmaligen Nachweis einer in-vitro Synthese der wichtigsten, myokardialen Proteine dar.

Gleichzeitig konnte der myokardiale Gehalt an verschiedenen, spezifischen mRNS-Spezies bestimmt werden (Myosin-mRNS für MHK, MLK 1 und MLK 2, Aktin-mRNS, Troponin-T-mRNS, Myoglobin-mRNS). Die myokardiale Myosin-H-Ketten-mRNS entspricht ca. 50% der gesamten, myokardialen mRNS, die Aktin-mRNS 5.1%, die Troponin-T-mRNS 1.6%, die Tropomyosin-mRNS 2.6%, die Myosin-Leicht-Ketten-1-mRNS 4%, die Myosin-Leicht-Ketten-2-mRNS 2.8% und die Myoglobin-mRNS 3.2%.

Bei der Untersuchung der subzellulären Verteilung der Gesamt-RNS, mRNS und Polyribosomen im Herzmuskel wurde eine charakteristische Verteilung beobachtet: Die Mehrzahl der myokardialen Gesamt-RNS (79.3%), mRNS (78.7%) und Polyribosomen (91.4%) befinden sich in der mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels, vergleichbar der Situation in anderen Organen. Zellkerne, Myofibrillen, Mitochondrien und Zellsaft (post-mikrosomaler) Überstand) enthalten nur einen geringen Prozentsatz der myokardialen Gesamt-RNS, mRNS und Polyribosomen.

Dabei zeigte sich, daß lediglich die mikrosomalen Polyribosomen bzw. die mikrosomale mRNS eine wesentliche Rolle bei der Synthese der myofibrillären Proteine spielen, nicht jedoch die Myofibrillen selbst (bzw. die in ihnen enthaltenen Polyribosomen), wie postuliert worden war (Narayanan and Eapen 1973 a, b). Präferenzen für die Synthese einzelner, spezifischer, myokardialer Proteine wurden hierbei nicht beobachtet.

Ein Pool nicht translatierter mRNS (16% der gesamten, zytoplasmären mRNS) wurde im myokardialen, post-mikrosomalen Überstand nachgewiesen und enthält zum Teil degradierte mRNS als Abbauprodukt der mikrosomalen mRNS. Ein Teil dieser post-mikrosomalen mRNS ist jedoch zweifellos intakt und kann möglicherweise bei Zuständen erhöhten, myokardialen Proteinsynthesebedarfs zur Steigerung der myokardialen Proteinsynthese genutzt werden, vergleichbar der Situation in anderen Organen, bei denen sich 10-80% der zytoplas-

mären mRNS im post-mikrosomalen Oberstand befinden (Civelli et al. 1980, Zähringer et al. 1976 b). Ferner befinden sich über 90% der myokardialen tRNS in freier Form bzw. als Aminoacyl-tRNS im post-mikrosomalen Oberstand des Herzmuskels.

Die in der vorliegenden Arbeit erstmalig zur zellfreien Synthese myokardialer Proteine durchgeführten Untersuchungen sollten insgesamt einen Beitrag zur Organisation der Proteinsynthese im Herzmuskel erbringen, letztlich unter der Zielvorstellung, daß durch molekularbiologische Untersuchungsmethoden zukünftig ein besseres Verständnis der Pathogenese von Herzmuskelerkrankungen erreichbar sein wird (vgl. auch Zähringer et al. 1980 b, 1981 b). Neu entwickelte Techniken wie die bakterielle Klonierung Plasmid-gebundener cDNS aus spezifischen mRNS-Spezies werden dabei unser Verständnis der Expression und Kontrolle spezifischer Komponenten komplexer Genome unter verschiedenen (normalen und pathologischen) Bedingungen noch erheblich erweitern.

6. LITERATUR

Abelson J (1979) RNA processing and the intervening sequence problem. Ann Rev Biochem 48, 1035-1069

Adamson S, Herbert E, Kemp S (1969) Effects of hemin and other porphyrins on protein synthesis in a reticulocyte lysate cell-free system. J Mol Biol 42, 247-258

Aloni Y and Attardi G (1971) Symmetrical in-vivo transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci USA 68, 1757-1761

Anderson W, Bosch L, Gros F, Grunberg-Manago M, Ochoa S, Rich A, Staehelin T (1974) Initiation of protein synthesis in procaryotic and eucaryotic systems. FEBS Letters 48, 1-6

Arnold H and Siddiqui M (1979) Control of embryonic development: Isolation and purification of chick heart myosin light chain mRNA and quantitation with a cDNA probe. Biochemistry 18, 647-654

Ashwell M and Work T (1970) The biogenesis of mitochondria. Ann Rev Biochem 39, 251-290

Avery O, MacLeod C, McCarty M (1944) Sudies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J Exp Med 79, 137-159

Aviv H and Leder Ph (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc Nat Acad Sci USA 69, 1408-1412

Bag J and Sarkar S (1975) Cytoplasmic nonpolysomal messenger ribonucleoprotein containing actin mRNA in chicken embryonic muscles. Biochemistry 14, 3800-3807

Bag J and Sarkar S (1976) Cytoplasmic nonpolysomal ribonucleoprotein coding for myosin heavy chains from chick embryonic muscles. J Biol Chem 251, 7600-7609

Baliga B, Pronczuk A, Munro H (1968) Regulation of polysome aggregation in a cell-free system through amino acid supply. J Mol Biol 34, 199-218

Baliga B, Zähringer J, Trachtenberg M, Moskowitz M, Munro H (1976) Mechanism of D-Amphetamine inhibition of protein synthesis. Biochim Biophys Acta 442, 239-250

Bantle J and Hahn W (1976 a) Complexity and characterization of polyadenylated RNA in mouse brain. Cell 8, 139-150

Bantle J, Maxwell J, Hahn W (1976 b) Specifity of oligo(dT)-cellulose chromatography in the isolation of polyadenylated RNA. Analytical Biochemistry 72, 413-427

Benne R and Hershy J (1976) Purification and characterization of initiation factor IF-E3 from rabbit reticulocytes. Proc Natl Acad Sci USA 73, 3005-3009

Benveniste K, Wilczek J, Ruggieri A, Stern R (1976) Translation of collagen messenger RNA in a cell-free system derived from wheat germ. Biochemistry 15, 830-835

Bester A, Kennedy D, Heywood S (1975) Two classes of translational control RNA: Their role in the regulation of protein synthesis. Proc Nat Acad Sci USA 72, 1523-1527

Bester A, Durrheim G, Kennedy D, Heywood S (1980) Isolation of myosin messenger ribonucleoprotein particles which contain a protein fraction affecting myosin synthesis. Biochem Biophys Res Commun 92, 524-531

Blobel G and Potter R (1967) Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. J Mol Biol 26, 279-301

Bogenhagen D, Sakonju S, Brown D (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription. II. The 3' border of the region. Cell 19, 27-35

Bonner W and Laskey R (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur J Biochem 46, 83-88

Borst P (1981) The expression of split gene in yeast mitochondrial DNA. Biochem Soc Trans 9, 51

Brawerman G (1974) Eukaryotic messenger RNA. Ann Rev Biochem 43, 621-642

Brot N (1977) Translocation. In: Weissbach H, Pestka S (Eds) Molecular mechanisms of protein biosynthesis. Academic Press New York San Francisco London, 375-411

Campbell P and Blobel G (1976) The role of organelles in the chemical modification of the primary translation products of secretory prteins. FEBS Letters 72, 215-226

Casey J, Cohen M, Rabinowitz M, Fukuhara H, Getz G (1971) Hybridization of mitochondrial transfer RNA's with mitochondrial and nuclear DNA of grande (wild type) yeast. J Mol Biol 63, 431-440

Caskey C (1980) Peptide chain termination. Trends in Biochemical Sciences (TIBS), 234-237

Chambon P (1975) Eukaryotic nuclear RNA polymerases. Ann Rev Biochem 44, 613-638

Chan S, Keim P, Steiner D (1976) Cell-free synthesis of rat preproinsulins: Characterization and partial amino acid determination. Proc Nat Acad Sci USA 73, 1964-1968

Civelli O, Vincent A, Maundrell K, Kuri J, Scherrer K (1980) The translational repression of globin mRNA in free cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. Eur J Biochem 107, 577-585

Darnbrough C, Legan S, Hunt T, Jackson R (1973) Initiation of protein synthesis: Evidence for messenger RNA-independent binding of methionyl-transfer RNA to the 40S ribosomal subunit. J Mol Biol 76, 379-403

Dintzis H (1961) Assembly of the peptide chains of hemoglobin. Proc Natl Acad Sci USA 47, 247-261

Driscoll H, Crim M, Zähringer J, Munro H (1978) Hepatic synthesis and urinary excretion of alpha 2u-globulin by male rats: Diurnal rhythm and response to fasting and refeeding. J Nutrition 108, 1691-1701

Efstratiadis A, Kafatos F, Maniatis T (1977) The primary structure of rabbit ß-globulin mRNA as determined from cloned DNA. Cell 10, 571-585

Etlinger J, Zak R, Fischmann D, Rabinowitz M (1975) Isolation of newly synthesized myosin filaments from skeletal muscle homogenates and myofibrils. Nature 255, 259-261

Faust C, Diggelmann H, Mach B (1973) Isolation of poly-adenylic-acid rich RNA from mouse myeloma and synthesis of complementary DNA. Biochemistry 12, 925-931

Fenner C, Valentine R, Mason D, Wikmann-Coffelt J (1975) Purification and characterization of cardiac tropomyosin. Prep Biochem 5, 189-197

Feuer G, Molnar E, Pettko E, Straub F (1948) Sudies on the composition and polymerization of actin. Hung Acta Physiol 1, 150-163

Gallop M and Paz M (1975) Posttranslational protein modifications, with special attention to collagen and elastin. Physiol Rev 55, 418-487

Gamulin S, Gray C, Normann M (1972) Comparison of methods for preparing polysomes free of glycogen. Biochim Biophys Acta 259, 239-242

Gamulin S and Narancsik P (1978) Alteration of hepatic polyribosome structure and function in mice during hypothermia. Exp Mol Pathol 28, 372-380

Gette W and Heywood S (1979) Translation of myosin heavy chain mRNA in an eukaryotic initiation factor 3- and messenger-dependent muscle cell-free system. J Biol Chem 254, 9879-9885

Gilbert J and Anderson W (1970) Cell-free hemoglobin synthesis. J Biol Chem 245, 2342-2349

Gilbert J and Anderson W (1971) tRNA-dependent cell-free hemoglobin synthesis. Meth Enzymol 20C, 542-549

Gillespie D, Marshall S, Gallo R (1972) RNA of RNA tumor viruses contains poly(A). Nature New Biol 236, 227-231

Gilham P (1964) The synthesis of polynucleotide-celluloses and their use in the fractionation of polynucleotides. J Mol Chem Soc 86, 4982-4989

Greaser M and Gergely J (1971) Reconstitution of troponin activity from three protein components. J Biol Chem 246, 4226-4233

Griffin G, Williams P, Goldspik G (1971) Region of longitudinal growth in striated muscle fibres. Nature New Biol 232, 28-29

Groner B, Hynes N, Sippel A, Jeep S, Huu M, Schütz G (1977) Immunoadsorption of specific chicken oviduct polysomes. J Biol Chem 252, 6666-6674

Grummt I, Hall S, Crouch R (1979) Localization of an endonuclease specific for double stranded RNA within the nucleolus and its implication in processing ribosomal transcripts. Eur J Biochem 94, 437-444

Gurdon J, Lane C, Woodland H, Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Nature 233, 177-182

Hadjiolov A (1977) Patterns of ribosome biogenesis in eukaryotes. Trends in Biochemical Sciences (TIBS), 84-86

Hager G, Holland M, Rutter W (1977) Isolation of RNA polymerases I, II and III from S. cerevisiae. Biochemistry 16, 1-18

Hagopian M, Anversa P, Loud A (1974) Quantitative radioautographic localization of newly synthesized protein in the postnatal rat heart. J Mol Cell Cardiol 7, 357-367

Halbreich A and Rabinowitz M (1971) Isolation of saccharomyces cerevisiae mitochondrial formyltetrahydrofolic acid: Methionyl-tRNA transformylase and the hybridization of mitochondrial fMet-tRNA with mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 68, 294-298

Harris R and Pestka S (1977) Peptide bond formation. In: Weissbach H, Pestka S (Eds) Molecular mechanisms of protein biosynthesis. Academic Press New York San Francisco London, 413-442

Heinrich P, Gross V, Northemann W, Scheurlen M (1978) Structure and function of nuclear ribonucleoprotein complexes. Rev Physiol Biochem Pharmacol 81, 102-134

Herson D, Schmidt A, Seal S, Marcus A (1979) Competitive mRNA translation in an in vitro system from wheat germ. J Biol Chem 254, 8245-8249

Hew C and Yip C (1976) Biosynthesis of polypeptide hormones. Canad J Biochem 54, 592-599

Heywood S, Dowben R, Rich A (1967) The identification of polyribosomes synthesizing myosin. Biochemistry 57, 1002-1009

Heywood S (1970) Specifity of mRNA binding factor in eukaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 67, 1782-1788

Heywood S, Kennedy D, Bester A (1974) Seperation of specific initiation factors involved in the translation of myosin and myoglobin mRNA and the isolation of a new RNA involved in translation. Proc Natl Acad Sci USA 71, 2428-2434

Heywood S and Kennedy D (1976) Translational control in embryonic muscle. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 19, 477-484

Heywood S and Kennedy D (1979) Messenger RNA affinity column fractionation of eukaryotic initiation factor and the translation of myosin messenger RNA. Arch Biochem Biophys 192, 270-281

Hirsch M and Penman S (1973) Mitochondrial polyadenylic acid-containing RNA: Localisation and characterization. J Mol Biol 80, 379-391

Hjalmarson A, Rannels D, Kao R, Morgan H (1974) Effects of hypophysectomy, growth hormone, and thyroxine on protein turnover in heart. J Biol Chem 250, 4556-4561

Holland M, Hager G, Rutter W (1977) Transcription of yeast DNA by homologous RNA polymerases I and II: Selective transcription of ribosomal genes by RNA polymerase I. Biochemistry 16, 16-24

Hollenberg C, Borst P, Thuring R, van Bruggen E (1969) Size, structure and genetic complexity of yeast mitochondrial DNA. Biochim Biophys Acta 186, 417-419

Hunt T, Hunter T, Munro A (1969) Control of haemoglobin synthesis: Rate of translation of the messenger RNA for the α and β chains. J Mol Biol 43, 123-133

Hunt T and Jackson R (1974) The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA. In: Neth R et al. (Eds) Modern trends in human leukemia. Lehmann Verlag München, 300-307

Hunt T, Vanderhoff G, London I (1972) Control of globin synthesis: The role of heme. J Mol Biol 66, 471-481

Irwin D, Kumar A, Malt R (1975) Messenger ribonucleoprotein complexes isolated with oligo(dT)-cellulose chromatography from kidney polysomes. Cell 4, 157-165

Jacob F and Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J Mol Biol 3, 318-356

Jain S, Pluskal M, Sarkar S (1979 a) Thermal chromatography of eukaryotic messenger ribonucleoprotein particles on oligo(dT)-cellulose. FEBS letters 97, 84-90

Jain S, Roy R, Pluskal M, Croall D, Guha C, Sarkar S (1979 b) A model of translational control involving mRNA associated proteins in chick embryonic muscles. Mol Biol Reports 5, 79-85

Jain S and Sarkar S (1979) Poly(A)-containing mRNP particles of chick embryonic muscles. Biochemistry 18, 745-752

Kabat D (1975) Potentiation of hemoglobin messenger ribonucleic acid. J Biol Chem 250, 6085-6092

Kagen L and Linder S (1969) Synthesis of myoglobin by muscle polysomes. Biochim Biophys Acta 195, 523-530

Katz A and Hall E (1963) Actin from heart muscle: Isolation, purification, and physicochemical properties. Circulation Res 13, 187-198

Kennedy D and Heywood S (1976) The role of muscle and reticulocyte initiation factor 3 on the translation of myosin and globin messenger RNA in a wheat germ cell-free system. FEBS Letters 72, 314-318

Khan M and Madan B (1978) Conformation of methylated sequences in HeLa cell 18S rRNA: Nuclease S1 as a probe. Eur J Biochem 84, 241-250

Kivirikko K and Risteli (1976) Biosynthesis of collagen and its alteration in pathological states. Medical Biology 54, 159-186

Knapp G, Odgen R, Peebles C, Abelson J (1979) Splicing of yeast tRNA precursors: Structure of the reaction intermediates. Cell 18, 37-45

Kölbel F, Mommaerts W, Vancura P, Kölblova V (1970) Cardiac muscle and liver ribosomes of the rat: The influence of laparatomy combined with adrenalectomy. Experientia 26, 361-362

Kominami R, Hamada H, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M (1978) 5' terminal processing of ribosomal 28S RNA. Biochemistry 17, 3965-3970

Kumar A and Pederson T (1975) Comparison of proteins bound to heterogeneous nuclear RNA, and messenger RNA in HeLa cells. J Mol Biol 96, 353-366

Laga E, Baliga B, Munro H (1970) Isolation and properties of polysomes from human placenta. Biochim Biophys Acta 213, 391-400

Laskey R, Mills A, Morris N (1977) Assembly of SV40 chromatin in a cell free system from Xenopus eggs. Cell 10, 237-244

Lewin B (1975) Units of transcription and translation: The relationship between heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA. Cell 4, 11-20

Lewin B (1980) Gene expression. Vol 2 Eukaryotic chromosomes. John Wiley and Sons, New York Chichester Brisbane Toronto, 641-906

Linder M and Munro H (1972) Assay of tissue ferritin. Anal Biochem 48, 266-278

Lingrel J and Borsook H (1963) A comparison of amino acid incorporation into the hemoglobin and ribosomes of narrow erythroid cells and circulating reticulocytes of severely anemic rabbits. Biochemistry 2, 309-314

Lingrel J (1972) Preparation and assay of hemoglobin mRNA. In: Methods in Mol. Biology, Vol 2: Protein biosynthesis in nonbacterial systems (Eds. Last J and Laskin A) 231-263

Lodish H and Jacobson M (1972) Regulation of hemoglobin synthesis. J Biol Chem 247, 3622-2629

Lodish H (1976) Translational control of protein synthesis. Ann Rev Biochem 45, 39-72

London I, Clemens M, Ranu R, Levin D, Cherbas L, Ernst V (1976) The role of hemin in the regulation of protein synthesis in erythroid cells. Fed Proc 35, 2218-2222

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275

MacLeod M (1975) Comparison of the properties of cytoplasmic poly (adenylic acid)-containing RNA from polysomal and non-polysomal fractions of murine myeloma cells. Biochemistry 14, 4011-4017

Maeno H, Schreiber G, Weigand K, Weinssen U, Zähringer J (1970) Impairment of albumin synthesis in cell-free systems from rat liver. FEBS Letters 6, 137-140

Maizel J (1971) Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. Meth Virol 5, 179-246

Mans R and Novelli G (1961) Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method. Arch Biochem Biophys 94, 48-53

Marcus A (1970) Tobacco Mosaic Virus ribonucleic acid-dependent amino acid incorporation in a wheat embryo system in vitro. J Biol Chem 245, 955-961

Marcus A and Feeley J (1964) Activation of protein synthesis in the inhibition phase of seed germination. PNAS 51, 1075-1079

Marcus A, Efron D, Weeks D (1974) The wheat embryo cell-free system. Meth Enzymol 30F, 749-754

Mathews M and Korner A (1970) Mammilian cell-free protein synthesis directed by viral ribonucleic acid. Eur J Biochem 17, 328-338

Maundrell K, Maxwell E, Civelli O, Vincent A, Goldenberg S, Buri J, Imaizumi-Scherrer M, Scherrer K (1979) Messenger ribonucleoprotein complexes in avian erythroblasts: Carriers of post-transcriptional regulation? Molec Biol Rep 5, 1-2, 43-51

McKeehan W (1974) Regulation of hemoglobin synthesis. J Biol Chem 249, 6517-6526

McKnight G and Schimke R (1974) Ovalbumin messenger RNA: Evidence that the initial product of transcription is the same size as polysomal ovalbumin messenger. Proc Natl Acad Sci USA 71, 4327-4331

Means A, Woo S, Harris S, O'Malley B (1975) Estragon induction of ovalbumin mRNA: Evidence for transcription control. Mol Cell Biochem 7, 33-42

Mechler B and Vassalli P (1975) Membrane-bound ribosomes of myeloma cells. J Cell Biol 67, 1-37

Meerson F, Iavich M, Lerman M (1974) Role of total ribonucleic acid concentration and the ratio of translating and nontranslating ribosomes in development of compensatory hypertrophy of the heart. Circulation Res (Supp. III) 34, 43-49

Metafora S, Felsani A, Cotrufo R, Tajana G, Iorio G, del Rio A, de Prisco P, Esposito V (1980) Neural control of gene expression in the skeletal muscle fibre: The nature of the lesion in the muscular protein-synthesizing machinery following denervation. Proc R Soc Lond B 209, 239-255

Metafora S, Felsani A, Cotrufo R, Tajana G, del Rio A, de Prisco P, Rutigliano B, Esposito V (1980) Neural control of gene expression in the skeletal muscle fibre: Changes in the muscular mRNA population following denervation. Proc R Soc Lond B 209, 257-273

Miller D and Weissbach H (1977) Factors involved in the transfer of aminoacyl-tRNA to the ribosome. In: Weissbach H, Pestka S (Eds) Molecular mechanisms of protein biosynthesis. Academic Press New York San Francisco London, 324-373

Mondal H, Sutton A, Chen V, Sarkar S (1974) Highly purified mRNA for myosin heavy chain: Size and polyadenylic acid content. Biochem Biophys Res Comm 56, 988-996

Morgan H, Earl D, Broadus A, Wolpert E, Giger K, Jefferson L (1971 a) Regulation of protein synthesis in heart muscle. J Biol Chem 246, 2151-2162

Morgan H, Jefferson L, Wolpert E, Rannels D (1971 b) Regulation of protein synthesis in heart muscle. J Biol Chem 246, 2163-2170

Morris G, Buzash E, Rourke A, Teppermann K, Thompson W, Heywood S (1972) Myosin messenger RNA: Studies on its purification, properties and translation during myogenesis in culture. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 37, 535-541

Munro H and Fleck A (1966) The determination of nucleic acids. Interscience, New York London Sydney. Methods of biochemical analysis 14, 113-176

Munro H, Hubert C, Baliga B (1975) Regulation of protein synthesis in relation to amino acid supply - a review. In: Rothschild M, Schreiber S (Eds) Alcohol and abnormal protein biosynthesis - biochemical and clinical. Pergamon Press Inc New York, 33-66

Munro H and Steinert P (1975) The intracellular organisation of protein synthesis. In: Amstein H (Ed) Synthesis of amino acids and protein, MTP International Review of Science, Biochemistry Series I, 7, 359-404

Narayanan N and Eapen J (1973 a) Cell-free synthesis of myosin by cardiac myofibrillar ribosomes. Biochem Biophys Res Commun 55, 508-514

Narayanan N and Eapen J (1973 b) Protein synthesis by rat cardiac myofibrils. Biochim Biophys Acta 512, 413-425

Nass M and Buck C (1970) Studies of mitochondrial tRNA from animal cells. J Mol Biol 54, 187-198

Nazar R, Sitz T, Busch H (1976) Sequence homologies in mammalian 5.8S RNA. Biochemistry 15, 505-508

Odgen R, Beckmann J, Abelson J, Kang H, Soll D, Schmidt O (1979) In vitro transcription and processing of a yeast tRNA gene containing an intervening sequence. Cell 17, 399-406

Ouellette A, Kumar A, Malt R (1976) Physical aspects and cytoplasmic distribution of messenger RNA in mouse kidney. Biochim Biophys Acta 425, 384-395

Palmiter R (1973) Ovalbumin messenger ribonucleic acid translation. J Biol Chem 248, 2095-2106

Palmiter R (1975) Quantitation of parameters that determine the rate of ovalbumin synthesis. Cell 4, 189-197

Pelham R and Jackson R (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur J Biochem 67, 247-256

Perlman S, Abelson H, Penman S (1973) Mitochondrial protein synthesis: RNA with the properties of eukaryotic messenger RNA. Proc Natl Acad Sci USA 70, 350-353

Perry R (1976) Processing of RNA. Ann Rev Biochem 45, 605-629

Peters T (1977) Intracellular albumin transport. In: Rosenoer V, Oratz M, Rothschild M (Eds) Albumin structure, function and uses. Pergamon Press, Oxford New York, 305-332

Picciano D, Prichard P, Merrick W, Shafritz D, Graf H, Crystal R, Anderson W (1973)Isolation of protein synthesis initiation factors from rabbit liver. J Biol Chem 248, 204-214

Piko L and Matsumoto L (1977) Complex forms and replicative intermediates of mitochondrial DNA in tissues from adult and senescent mice. Nucleic Acids Res 4, 1301-1314

Pollard T and Weihing R (1974/75) Actin and myosin and cell movement. CRC - Critical Reviews in Biochemistry, 2, 1-65

Princen H, Ekelen C, Asselberg F, Venrooij W (1979) Free cytoplasmic messenger ribonucleoprotein complexes from rabbit reticulocytes. Molec Biol Rep 5, 59-64

Pronczuk A, Baliga B, Triant J, Munro H (1968) Comparison of the effect of amino acid supply on hepatic polysome profiles in vivo and in vitro. Biochim Biophys Acta 157, 204-206

Przybyla A and Strohman R (1974) Myosin heavy chain messenger RNA from myogenic cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA 71, 662-666

Rabinowitz M, Freedman M, Fisher J, Maxwell C (1969) Translational control in hemoglobin synthesis. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 34, 567-578

Rabinowitz M (1973) Protein synthesis and turnover in normal and hypertrophied heart. Am J Cardiol 31, 202-220

Rabinowitz M (1974) Translational repression in the control of globin chain initiation by hemin. Ann NY Acad Sci 241, 322-333

Rajamanickam C, Merten S, Kwiatkowska-Patzer B, Chuang C, Zak R, Rabinowitz M (1979) Changes in mitochondrial DNA in cardiac hypertrophy in the rat. Circulation Res 45, 50&-515

RamseyJand Steele W (1976) A procedure for the quantitative recovery of homogeneous populations of undegrated free an bound polysomes from rat liver. Biochemistry 15, 1704-1712

Ramsey J and Steele W (1977) Differences in size, structure and function of free and membrane-bound polyribosomes of rat liver. Biochem J 168, 1-8

Redman C (1969) Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. J Biol Chem 244, 4308-4315

Revel M (1977) Initiation of messenger RNA translation into protein and some aspects of its regulation. In: Weissbach H, Pestka S (Eds) Molecular mechanisms of protein biosynthesis. Academic Press New York San Francisco London, 246-321

Revel M and Groner Y (1978) Post-translational and translational controls of gene expression in eukaryotes. Ann Rev Biochem 47, 1079-1126

Richter D and Isono K (1977) The mechanism of protein synthesis - initiation, elongation and termination of translation of genetic messages. Current Topics in Microbiology and Immunology 76, 83-125

Robberson D, Aloni Y, Attardi G, Davidson N (1971) Expression of the mitochondrial genome in HeLa-cells. VI. Size determination of mitochondrial ribosomal RNA by electron microscopy. J Mol Biol 60, 473-484

Roberts B and Paterson B (1973) Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. Proc Nat Acad Sci USA 70, 2330-2334

Roeder R (1976) Eucaryotic nuclear RNA polymerases. In: Losick R, Chamberlin M (Eds) RNA polymerase. Cold Spring Harbor Laboratory New York, 285-329

Rothschild H, Oratz M, Schreiber S (1977) Albumin synthesis. In: Rosenoer, Oratz, Rothschild (Eds) Albumin, Structure, Function, Uses. Pergamon Press Oxford England, 228-253

Safer B, Adams S, Kemper W, Berry K, Lloyd M, Merrick W (1976) Purification and characterization of two initiation factors required for maximal activity in highly fractionated globin mRNA translation system. Proc Natl Acad Sci USA 73, 2584-2588

Sala-Trepat J, Savage M, Bonner J (1978) Isolation and characterization of poly(adenylic acid)-containing messenger ribonucleic acid from rat liver polysomes. Biochim Biophys Acta 519. 173-193

Sanger F (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. Bioscience Reports 1, 3-18

Sarkar S, Mukherjee S, Sutton A, Mondal H, Chen V (1973) Isolation of messenger ribonucleic acid for myosin heavy chain. Prep Biochem 3, 583-604

Schatz G (mit Böhni P, Gasser S, Lewin A, Ohashi A, Suisse M) (1981) Import of proteins into mitochondria. Biochem Soc Transactions 9, 52

Scherrer K, Imaizumi-Scherrer M, Reynaud C, Therwath A (1979) On pre-messenger RNA and transcriptons a review. Mol Biol Rep 5, 1-2, 5-28

Scherrer K, Spohr G, Granboulan N, Morel C, Grossclaude J, Chezzi C (1970) Nuclear and cytoplasmic messenger-like RNA and their relation to the active messenger RNA in polyribosomes of HeLa cells. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 35, 539-554

Schimke R, Rhoads R, McKnight G (1974) Assay of ovalbumin mRNA in reticulocyte lysate. Meth Enzymol 30F, 694-708

Schreiber G (1971) Translation of genetic information on the ribosome. Angewandte Chemie 10, 638-658

Schreiber G, Lesch R, Weinssen U, Zähringer J (1970) The distribution of ovalbumin syntheeis througout the liver lobule. J Cell Biol 47, 285-289

Schreiber G and Urban J (1978) The synthesis and secretion of albumin. Rev Physiol Biochem Pharmacol 82, 27-29

Schreiber G, Urban J, Zähringer J, Reutter W, Frosch U (1971) The secretion of serum protein and the synthesis of albumin and total protein in regenerating rat liver. J Biol Chem 246, 4531-4538

Scornik O (1974) In-vivo rate of translation by ribosomes and normal and regenerating liver. J Biol Chem 249, 3876-3883

Shore G and Tata J (1977) Functions for polyribosome-membrane interactions in protein synthesis. Biochim Biophys Acta 472, 197-236

Spirin A (1969) Informosomes. Eur J Biochem 10, 20-35

Spirin A (1979) Messenger ribonucleoproteins (informosomes) and RNA-binding proteins. Mol Biol Reports 5, 53-57

Spudich J and Watt S (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. J Biol Chem 246, 4866-4871

Srivastava U (1969) Polyribosome concentration of mouse skeletal muscle as a function of age. Arch Biochem Biophys 130, 129-139

Stevenin J, Jacob M (1979) Structure of pre-mRNP. Models and pitfalls. Mol Biol Reports 5, 29-35

Stevens R and Williams A (1973) Isolation of messenger RNA coding for mouse heavy-chain immunoglobin. Proc Natl Acad Sci USA 70, 1127-1131

Strycharz W, Ranki M, Dahl H (1974) A high-molecular-weight protein component required for natural messenger translation in ascites tumor cells. Eur J Biochem 48, 303-310

Taylor J (1979) The isolation of eukaryotic messenger RNA. Ann Rev Biochem 48, 681-717

Thomas A, Benne R, Voorma H (1981) Initiation of eukaryotic protein synthesis. FEBS Letters 128, 177-185

Thompson H, Sadnik I, Scheinbuks J, Moldave K (1977) Studies on ribosomal subunits from rat liver. Purification and characterization of a ribosome dissoziation factor. Biochemistry 16, 2221-2230

Tse T and Taylor J (1977) Translation of albumin messenger RNA in a cell-free protein-synthesizing system derived from wheat germ. J Biol Chem 252, 1272-1278

Venkatesan N and Steele W (1975) Effects of phenobarbital on protein synthesis and polysome levels in rat liver. Chem Biol Interactions 11, 41-54

Villa-Komaroff L, McDowell M, Baltimore D, Lodish H (1974) Translation of reovirus mRNA, poliovirus RNA, and bacteriophage Qß RNA in cell-free extracts of mammilian cells. Meth Enzymol 30F, 709-723

Voorma H, Amesz H, Goumans H, Van der Mast C, Thomas A (1977) New procedures in the purification of factors involved in eukaryotic initiation. FEBS Meet. 11Th Copenhagen ppA 2-5-252-2

Voorma H, Thomas A, Goumans H, Amesz H, Van der Mast C (1979) Isolation and purification of initiation factors from rabbit reticulocyte lysate. Meth Enzymol 60, 124-135

Wall R, Lippmann S, Toth K, Federoff N (1977) A general method for the large-scale isolation of polysomes and messenger RNA applied to MOPC 21 mouse myeloma tumors. Analyt Biochem 82, 115-129

Watson J and Crick F (1953) Molecular structure of nuclei acids. Nature 171, 737-738

Wellauer P, Dawid I, Kelley D, Perry R (1974) Secondary structure maps of ribosomal RNA. II. Processing of mouse L cell rRNA and variations in the processing pathway. J Mol Biol 89, 397-407

Wellauer P and Dawid I (1979) Isolation and sequence organization of human ribosomal DNA. J Mol Biol 128, 289-304

Williams P and Goldspink G (1971) Longitudinal growth of striated muscle fibres. J Cell Sci 9, 751-767

Wintersberger (1978) DNA-Replication in eukaryotes. Rev Physiol Biochem Pharmacol 84, 93-142

Wool I (1979) The structure and function of eukaryotic ribosomes. Ann Rev Biochem 48, 719-754

Yap S, Strair R, Shafritz D (1977) Distribution of rat liver albumin mRNA membrane-bound and free in polyribosomes as determined by molecular hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 74, 5397-5401

Zähringer J, Konijn A, Baliga B, Munro H (1975) Mechanism of iron induction of ferritin synthesis. Biochem Biophys Res Commun 65, 583-590

Zähringer J, Baliga B, Munro H (1976 a) Subcellular distribution of total Poly(A)-containing RNA and ferritin-mRNA in the cytoplasm of rat liver. Biochem Biophys Res Commun 68, 1088-1093

Zähringer J, Baliga B, Munro H (1976 b) Novel mechanism for translational control in the regulation of ferritin synthesis by iron. Proc Natl Acad Sci USA 73, 857-861

Zähringer J, Baliga B, Munro H (1976 c) Increased levels of microsomal albumin-mRNA in the liver of nephrotic rats. FEBS Letters 62, 322-325

Zähringer J, Baliga B, Crim M, Munro H (1977 a) Hepatic synthesis of export proteins. In: Rosenoer V, Oratz M, Rothschild M (Eds) Albumin structure, function and uses. Pergamon Press Oxford New York Toronto, 203-225

Zähringer J, Baliga B, Drake R, Munro H (1977 b) Distribution of ferritin-mRNA and albumin-mRNA between free and membrane-bound rat liver polysomes. Biochim Biophys Acta 474, 234-244

Zähringer J, Baliga B, Munro H (1979 a) Relative abundance of specific messenger-RNA species in the free mRNP fraction of rat liver. FEBS Letters 108, 317-320

Zähringer J (1979 b) Die Regulation der Herzmuskelproteinsynthese Klin Wschr 57, 541-553

Zähringer J and Kandolf R (1980 a) Isolation, subcellular distribution and in-vitro translation of myocardial mRNA and polyribosomes. Circulation 62, Supp III, 114

Zähringer J, Höfling B, Raum W, Kandolf R (1980 b) Effect of adriamycin on the polyribosome and messenger-RNA content of rat heart muscle. Biochim Biophys Acta 608, 315-323

Zähringer J (1980 c) Struktur und Funktion von Ferritin. In: Kaltwasser J und Werner E (Hrsg) Serumferritin. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1-24

Zähringer J, Kandolf R, Raum W, Troesch G, Stäb G, Jäger E (1981 a) Isolation and characterization of structurally and functionally intact polyribosomes and mRNA from rat heart muscle. J Mol Cell Cardiol 13, 127-146

Zähringer J, Kandolf R, Raum W (1981 b) Decrease of myocardial messenger RNA in adriamycin-treated rats. FEBS Letters 123, 169-172

Zähringer J (1981 c) Genexpression und Proteinsynthese im normalen Herzmuskel und bei der Adriamycin-Kardiomyopathie. Habilitationsschrift (Ludwig-Maximilians-Universität München)

Zak R, Rabinowitz M, Platt C (1967) Ribonucleic acids associated with myofibrils. Biochemistry 6, 2493-2499

7. ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
DOC	Desoxycholsäure
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	complementäre DNS
CPK	Creatinphosphokinase
EDTA	Dinatriumsalz der Äthylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,N'-tetra-essigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
Hepes	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-Äthansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
MHK	Myosin-H-Kette
MLK	Myosin-L-Kette
PMS	Post-mitochondrialer Überstand ("Supernatant")
Poly(A)	Poly(adenylat)
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNS	Ribonukleinsäure
HnRNS	Heteronukleäre RNS
mRNS	Messenger-RNS
rRNS	Ribosomale RNS
tRNS	Transfer-RNS
S	Svedbergeinheit
SA	Spezifische Aktivität
SDS	Natriumdodecylsulfat
Temed	Tetramethyläthylendiamin
TES	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumenanteile

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. Riecker danke ich für seine großzügige Unterstützung der vorliegenden Untersuchungen.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. J. Zähringer für die Anregung und Betreuung der vorliegenden Arbeit, sowie für seine stete Bereitschaft zu intensiver Unterstützung und Hilfestellung.

Herrn Priv. Doz. Dr. E. Erdmann und seinen Mitarbeitern/Mitarbeiterinnen danke ich für anregende Diskussionen und wichtige Ratschläge.

Wertvolle Anregungen verdanke ich Herrn Dr. H. Mondal, Herrn Dr. P. Palm und Herrn Dr. E. Hansen, MPI für Biochemie, Martinsried bei München, sowie Herrn Dr. R. J. Jackson, Department of Biochemistry, University of Cambridge, England.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau E. Jäger, Frau G. Stäb und Frau A. K. Junk, deren exzellente Mitarbeit zum Gelingen der oft umfangreichen Experimente wesentlich beigetragen hat.

LEBENSLAUF

Reinhard K a n d o l f

10.9.1948	geboren in Neustadt am Kulm als Sohn des jetzigen Rektors in Nürnberg Gerhard Kandolf und seiner Ehefrau Alma, geb. Baumann
1954 - 58	Besuch der Grundschule in Speichersdorf und in Floß bei Weiden, Oberpfalz
1958 - 62	Besuch der Knabenoberrealschule in Weiden
1962 - 67	Besuch des Hans-Sachs-Gymnasiums in Nürnberg, wo mir am 21.7.1967 das Zeugnis der Reife ausgestellt wurde.
ab SS 68	Studium der Psychologie mit Schwerpunkt Psychosomatik, Neurophysiologie und Verhaltensforschung mit Diplomhauptprüfung für Psychologen im Fachbereich Klinische Psychologie der LMU München. Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr.med.Dr.rer.nat.J.C.Brengelmann Ph.D., Direktor der Psychologischen Abteilung am MPI für Psychiatrie München, mit dem Thema: Psychosomatische Reaktionen und Formen der Bewältigung bei kardiovaskulären Erkrankungen.
ab SS 75	Studium der Humanmedizin an der LMU München
März 1977	Ärztliche Vorprüfung
März 1978	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juli 1978	Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit im Forschungslabor von Herrn Dr.J.Zähringer an der Med. Klinik I, Direktor Prof.Dr.G.Riecker, Klinikum Großhadern der Universität München.
März 1980	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, anschließend Praktisches Jahr: Innere Medizin an der Med. Klinik I, Klinikum Großhadern, Direktor Prof.Dr.G.Riecker, Chirurgie an der Klinik und Polyklinik für Chirurgie, Klinikum Großhadern, Direktor Prof.Dr.G.Heberer, Neurologie an der Neurologischen Klinik, Klinikum Großhadern, Direktor Prof.Dr.A.Schrader, Gynäkologie und Geburtshilfe an der Frauenklinik, Klinikum Großhadern, Direktor Prof.Dr.K.Richter.
April/Mai 1981	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5.6.1981	Approbation als Arzt
Juli 1981	Vorbereitung und Beginn eines Forschungsaufenthaltes am MPI für Biochemie, Martinsried bei München, in der Abteilung von Herrn Prof.Dr.Dr.P.H.Hofschneider mit dem Thema: Molekularbiologische Untersuchungen zur Virusmyokarditis mittels rekombinanter DNS Technologie.